



Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Identificação dos mosquitos vetores de
dirofilariose canina em Portugal**

Verónica de Pinho Mixão

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
PARASITOLOGIA MÉDICA**

(DEZEMBRO, 2014)



Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Identificação dos mosquitos vetores de
dirofilariose canina em Portugal**

Autor: Verónica de Pinho Mixão

Orientador: Professora Doutora Maria Teresa Lourenço Marques Novo

Coorientador: Professora Doutora Maria Manuela Palmeiro Calado

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Parasitologia Médica, de acordo com o regulamento presente nos

Artigos 15º a 27º do Decreto-Lei n.º 107/2008 de 25 de Junho

Apoio financeiro da Fundação da Ciência e Tecnologia através do projeto PTDC/SAU-SAP/113523/2009

Bibliografia resultante da dissertação

Artigo submetido para a revista *Parasites & Vectors*

Ferreira C[#], Mixão V[#], Novo MT, Calado MM, Gonçalves L, Belo S, Almeida APG. First molecular identification of mosquito vectors of *Dirofilaria immitis* in continental Portugal. [#] Autores contribuíram igualmente para o trabalho

Resumo publicado

Mixão V, Ferreira C, Calado M, Belo S, Almeida APG, Novo MT (2014). Potenciais vetores de dirofilariose canina nos distritos de Coimbra, Santarém e Setúbal, 2011-2013. *Acta Parasitológica Portuguesa*, **20**(1/2): 146-147.

Comunicação oral no XVII Congresso Português de Parasitologia, Coimbra, 20-21 de novembro de 2014

Mixão V, Ferreira C, Calado M, Belo S, Almeida P, Novo T. Potenciais vetores de dirofilariose canina nos distritos de Coimbra, Santarém e Setúbal, 2011-2013.

*Aos meus pais,
por todo o seu amor, carinho e dedicação...*

Agradecimentos

Ao Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, pelo seu acolhimento, e à Fundação para a Ciência e a Tecnologia pelo financiamento do projeto no âmbito do qual se insere esta tese.

À minha orientadora, a Professora Doutora Teresa Novo, não só pelo seu empenho e dedicação na concretização deste trabalho, mas, também, pela paciência, pela ajuda e, fundamentalmente, pelo enorme apoio que me deu ao longo deste tempo. Agradeço, também, à minha coorientadora, a Professora Doutora Manuela Calado, não só pela sua ajuda, mas também pelos sábios e sensatos conselhos que me concedeu.

Um obrigada gigante, e que é muito especial, é para uma pessoa fantástica e muito generosa, que muito me ensinou, e que foi a minha grande companheira nesta fase, a Cátia.

Ao Professor Doutor Paulo Almeida por toda a ajuda na definição do meu caminho e por toda a contribuição neste trabalho. À Professora Doutora Silvana Belo e a todos os membros do Grupo de Helmintologia Médica por todas as oportunas sugestões. À Professora Doutora Luzia Gonçalves pela sua disponibilidade e ajuda. A todos os professores que de alguma forma marcaram o meu caminho.

Aos bolsiros do Grupo de Entomologia Médica pela disponibilidade para me ajudarem e partilharem o material de laboratório sempre que precisei.

Aos meus colegas de curso: à Marta, à Joana, ao Hélder, ao Tiago, ao Gonçalo (obrigada pelas excelentes críticas construtivas!) e, claro, à minha amiga Mariana, por tudo. Um grande obrigada ao José Manuel, sem o qual eu não teria conseguido todo este trabalho, neste espaço de tempo, por toda a generosidade ao partilhar comigo a sua experiência, tentando sempre arranjar soluções para as adversidades com que me deparei (e, claro, por todo o tempo que me poupou!).

Ao António e, novamente, à Cátia, à Mariana e ao Hélder pela excelente companhia e pelas boas horas que passámos juntos. A todos os meus amigos que com toda a certeza sabem quem são. Ao "nha cretcheu" por fazer parte do meu dia-a-dia.

Aos meus queridos avós, por todo o apoio e por toda a compreensão. À Pati pela paciência. E, por fim, mas não menos importante, muito pelo contrário, agradeço aos meus pais, por estarem sempre onde e quando eu preciso e por serem, simplesmente, os melhores pais do mundo. Obrigada!

Resumo

A dirofilariose canina é uma doença de transmissão vetorial, provocada por nemátodes do género *Dirofilaria*. É uma zoonose emergente, que tem vindo a alastrar por toda a Europa, sendo endémica nos países do Mediterrâneo, como Portugal. O tratamento pode envolver complicações de saúde para os cães, levando, por vezes, à sua morte. Desta forma, o controlo da doença passa maioritariamente pela prevenção, como por exemplo, através da aplicação de profilaxia adequada, de forma a diminuir o contato entre mosquitos infetantes e hospedeiros vertebrados não infetados. Uma vez que a transmissão é dependente, não só da presença de um número suficiente de cães microfilarémicos, mas, também, de mosquitos suscetíveis e de um clima apropriado à incubação extrínseca do parasita no mosquito vetor, esta prevenção deverá ter em conta o período durante o qual ocorre transmissão, numa dada região. Este mesmo período é dependente da(s) espécie(s) de mosquitos vetores, dado que cada uma terá uma bioecologia e comportamento próprios, que poderão ter reflexos ao nível epidemiológico da doença, devido, por exemplo, à temperatura à qual ocorre o desenvolvimento do parasita. Assim, para avaliar o risco de exposição animal e humana à doença, e, ainda, ajudar a selecionar medidas profiláticas e de controlo apropriadas, é de extrema relevância saber quais os vetores de dirofilariose canina numa determinada região. No que respeita aos vetores desta doença em Portugal, muito poucos estudos têm sido realizados, sendo o objetivo principal deste trabalho identificar os vetores de dirofilariose canina neste país endémico. Para isso, foram efetuadas colheitas de mosquitos em 3 distritos com reconhecida endemicidade para a doença, nomeadamente Coimbra, Santarém e Setúbal, durante dois anos. Estes mosquitos foram morfológicamente identificados e separados em abdómen e tórax+cabeça, de forma a permitir a distinção entre mosquitos infetados e mosquitos potencialmente infetantes, respetivamente. Posteriormente, recorrendo à técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os *primers* específicos DIDR-F1 e DIDR-R1, fez-se a deteção de ADN do parasita no mosquito. Das 9156 fêmeas de mosquito capturadas, 63,48% pertenciam a *Culex theileri*, 21,19% a *Culex pipiens* s.l., 6,56% a *Aedes caspius*, 4,43% a *Anopheles maculipennis* s.l., 1,58% a *Culex univittatus*, 0,33% a *Culiseta longiareolata*, 0,25% a *Aedes detritus* s.l., 0,19% a *Culiseta annulata*, 0,04% a *Anopheles claviger* s.l., 0,03% a *Culiseta subochrea*, 0,02% a *Aedes berlandi*, 1,6% a *Culex* sp. e em 0,3% não foi possível identificar se seriam *Cx. theileri* ou *Cx. univittatus*. De todas as espécies capturadas, apenas em *Cx. theileri*, *An. maculipennis* s.l., *Ae. caspius*, *Ae. detritus* s.l. e *Cx. pipiens* s.l. foi detetado ADN de *D. immitis*, sendo que, à exceção da última espécie referida, em todas foi encontrado, pelo menos, um indivíduo potencialmente infetante. Assim, pode concluir-se que os potenciais vetores de dirofilariose canina em Portugal são mosquitos pertencentes às espécies *Cx. theileri*, *Ae. caspius*, *An. maculipennis* s.l. e *Ae. detritus* s.l., sendo necessários mais estudos para melhor avaliar o papel de *Cx. pipiens* s.l. na transmissão desta doença.

Palavras-chave: Dirofilariose, vetores, Portugal, PCR

Abstract

Canine dirofilariosis is a vector-borne disease caused by nematodes of the genus *Dirofilaria*. This is an emerging zoonosis that has been spreading throughout Europe and it is endemic in Mediterranean countries such as Portugal. Its treatment may involve health complications for dogs, sometimes leading to their death. Therefore, to control of this disease, prevention is extremely important, for example, by applying suitable prophylaxis or by reducing contact between infected mosquitoes and not infected hosts. Because the transmission is dependent not only on the presence of a sufficient number of microfilaremic dogs, but also of susceptible mosquitoes and an appropriate environment that allows the extrinsic incubation of parasite in the mosquito vector, this prevention should take into account the time during which transmission occurs in a given area. This period is dependent on vector species, since each one has its own bioecology and behavior, which may affect the epidemiology of the disease, due, for instance, the temperature at which parasite development occurs in his invertebrate host. Thus, to assess the risk of human and animal exposure to the disease and also to select appropriated control measures, it is extremely important to know which species act as vectors of canine dirofilariosis in a given area. With respect to the vectors of this disease in Portugal few studies have been carried out so the main objective of this work was to identify the vectors of canine dirofilariosis in this endemic country. With this aim, mosquitoes were captured in three districts with recognized endemicity for this disease, namely, Coimbra, Santarém and Setúbal, for two years. These mosquitoes were morphologically identified and separated into abdomen and thorax+head, in order to distinguish between infected and potentially infective mosquitoes, respectively. Subsequently, using the technique of polymerase chain reaction (PCR) with the specific primers DIDR-F1 and DIDR-R1, parasite DNA was detected in mosquitoes' samples. Of 9156 female mosquitoes captured, 63.48% were *Culex theileri*, 21.19% *Culex pipiens* s.l., 6.56% *Aedes caspius*, 4.43% *Anopheles maculipennis* s.l., 1.58% *Culex univittatus*, 0.33% *Culiseta longiareolata*, 0.25% *Aedes detritus* s.l., 0.19% *Culiseta annulata*, 0.04% *Anopheles claviger* s.l., 0.03% *Culiseta subochrea*, 0.02% *Aedes berlandi*, 1.6% *Culex* sp. and 0.3% were mosquitoes with no possible distinction between *Cx. theileri* and *Cx. univittatus*. From the species captured, *Cx. theileri*, *An. maculipennis* s.l., *Ae. caspius*, *Ae. detritus* s.l. and *Cx. pipiens* s.l. were found PCR positive for *D. immitis*, and, except for the last mentioned species, at least one potentially infective individual was found in all of them. Thus, it can be concluded that the potential vectors of canine heartworm disease in Portugal are mosquitoes belonging to the species *Cx. theileri*, *Ae. caspius*, *An. maculipennis* s.l. and *Ae. detritus* s.l., being necessary further studies to better understand the role of *Cx. pipiens* s.l. in heartworm disease transmission.

Key-words: Dirofilariosis; vectors; Portugal; PCR

Índice

Índice de Figuras	xiii
Índice de Quadros e Tabelas	xvii
Lista de abreviaturas, acrónimos e siglas	xix
1. Introdução	3
1.1 Dirofilariose canina	3
1.1.1. A doença	3
1.1.2 Epidemiologia e distribuição geográfica	5
1.1.3 Em Portugal	7
1.1.4 Modelos de previsão da transmissão de dirofilariose	9
1.2 O parasita	11
1.2.1 Sistemática e morfologia	11
1.2.2 Biologia e ciclo de vida	13
1.3 Vetores de dirofilariose canina	16
1.4 Interação parasita - hospedeiro invertebrado	19
2. Objetivos	24
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivos específicos	25
3. Materiais e Métodos	29
3.1 Colheita de mosquitos	29
3.1.1 Área de estudo	29
3.1.2 Amostragem culicideológica	31
3.1.3 Identificação morfológica dos mosquitos capturados	32
3.1.4 Densidade populacional	33
3.2 Detecção do ADN do parasita no hospedeiro invertebrado	34
3.2.1 Extração de ADN	34
3.2.2 Amplificação do ADN do parasita	34
3.2.3 Determinação da sensibilidade do PCR	35
3.2.4 Purificação do ADN do parasita e sequenciação	36
3.2.5 Cálculo da taxa mínima de infeção	36
3.3 Identificação molecular das espécies de <i>Culex pipiens</i> s.l. potenciais vetores	37

3.3.1	Identificação da forma genética de <i>Culex pipiens</i>	37
3.3.2	Distinção entre <i>Cx. pipiens</i> f. <i>molestus</i> e <i>Cx. quinquefasciatus</i>	38
3.4	Identificação do período de potencial transmissão de <i>D. immitis</i>	39
4.	Resultados.....	43
4.1	Colheita de mosquitos	43
4.2	Deteção de ADN do parasita no hospedeiro invertebrado.....	56
4.3	Mosquitos potencialmente vetores por mês e distrito	60
4.3.1	<i>Anopheles maculipennis</i> s.l.....	60
4.3.2	<i>Culex pipiens</i> s.l.	62
4.3.3	<i>Culex theileri</i>	66
4.3.4	<i>Aedes caspius</i>	68
4.3.5	<i>Aedes detritus</i> s.l.	70
4.4	Identificação do período de potencial transmissão de <i>D. immitis</i>	72
5.	Discussão e Conclusões.....	77
6.	Referências bibliográficas.....	91
7.	Anexos	105
7.1	Anexo I	105
7.2	Anexo II.....	107
7.3	Anexo III.....	109
7.4	Anexo IV	111
7.5	Anexo V.....	113
7.6	Anexo VI	115

Índice de Figuras

Figura 1. Distribuição geográfica da dirofilariose canina.	5
Figura 2. Previsão do período de transmissão de <i>D. immitis</i> , em alguns países europeus, através de modelo baseado no sistema de <i>growing degree days</i>	8
Figura 3. Adultos de <i>D. immitis</i>	12
Figura 4. Ciclo de vida de <i>D. repens</i> e <i>D. immitis</i>	13
Figura 5. Esquema do aparelho digestivo de um mosquito fêmea.	14
Figura 6. Localização do parasita adulto no hospedeiro definitivo.	15
Figura 7. Ciclo de vida generalizado dos membros da família Culicidae.	17
Figura 8. Armadura cibarial de <i>Cx. pipiens</i>	20
Figura 9. Microfilária de <i>D. immitis</i> completamente melanizada no hemocélio de um mosquito da espécie <i>Armigeres subalbatus</i>	21
Figura 10. Mapa de Portugal com os distritos de Coimbra, Santarém e Setúbal assinalados.	29
Figura 11. Frequência relativa das diferentes espécies de mosquitos capturadas nos distritos de Coimbra, Santarém e Setúbal, por CDC e IR durante o 1º ano de colheitas.	45
Figura 12. Frequência relativa das diferentes espécies de mosquitos capturadas nos distritos de Coimbra, Santarém e Setúbal, por CDC e IR durante o 2º ano de colheitas.	45
Figura 13. Densidades populacionais médias em Coimbra, Santarém e Setúbal nos dois anos de colheitas, para as armadilhas CDC.	47
Figura 14. Densidades populacionais médias em Coimbra, Santarém e Setúbal nos dois anos, para colheitas em repouso.	49
Figura 15. Densidade populacional média de cada espécie, para as armadilhas tipo CDC, no distrito de Coimbra, durante os dois anos de colheitas.	51
Figura 16. Densidade populacional média de cada espécie, para as colheitas IR, no distrito de Coimbra, durante os dois anos de colheitas.	51

Figura 17. Densidade populacional média de cada espécie, para as armadilhas tipo CDC, no distrito de Santarém, durante os dois anos de colheitas.	52
Figura 18. Densidade populacional média de cada espécie, para as colheitas IR, no distrito de Santarém, durante os dois anos de colheitas.	53
Figura 19. Densidade populacional média de cada espécie, para as armadilhas tipo CDC, no distrito de Setúbal, durante os dois anos de colheitas.	54
Figura 20. Densidade populacional média de cada espécie, para as colheitas IR, no distrito de Setúbal, durante os dois anos de colheitas.	55
Figura 21. Electroforese em gel de agarose 1,5% do produto de PCR de amostras positivas.	57
Figura 22. Fêmea de <i>An. maculipennis</i> s.l. recém alimentada, capturada em 2012 no distrito de Santarém.	61
Figura 23. Densidade populacional média de <i>An. maculipennis</i> s.l., nas armadilhas tipo CDC, nos vários meses de colheita, por distrito.	61
Figura 24. Densidade populacional média de <i>An. maculipennis</i> s.l., nas colheitas IR, nos vários meses de colheita, por distrito.	62
Figura 25. Fêmea de <i>Cx. pipiens</i> s.l. sem refeição sanguínea recente, capturada em 2012 no distrito de Santarém.	63
Figura 26. Densidade populacional média de <i>Cx. pipiens</i> s.l., nas armadilhas tipo CDC, nos vários meses de colheita, por distrito.	63
Figura 27. Densidade populacional média de <i>Cx. pipiens</i> s.l., nas colheitas IR, nos vários meses de colheita, por distrito.	64
Figura 28. Electroforese em gel de agarose 1,5% do produto de PCR para identificação da forma genética de <i>Cx. pipiens</i>	65
Figura 29. Electroforese em gel de agarose 1,5% do produto de PCR para identificação da espécie do complexo <i>Cx. pipiens</i>	65
Figura 30. Fêmea de <i>Cx. theileri</i> grávida, retirada em 2012 da colónia mantida em insetário no Instituto de Higiene e Medicina.	66

Figura 31. Densidade populacional média de <i>Cx. theileri</i> , nas armadilhas tipo CDC, nos vários meses de colheita, por distrito.	67
Figura 32. Densidade populacional média de <i>Cx. theileri</i> , nas colheitas IR, nos vários meses de colheita, por distrito.....	67
Figura 33. Fêmea de <i>Ae. caspius</i> sem refeição sanguínea, capturada em 2012 no distrito de Santarém.....	68
Figura 34. Densidade populacional média de <i>Ae. caspius</i> , nas armadilhas tipo CDC, nos vários meses de colheita, por distrito.	69
Figura 35. Densidade populacional média de <i>Ae. caspius</i> , nas colheitas IR, nos vários meses de colheita, por distrito.....	69
Figura 36. Fêmea de <i>Ae. detritus</i> s.l., capturada em 2000 no distrito de Setúbal – Exemplar da entomoteca do Instituto de Higiene e Medicina Tropical.	70
Figura 37. Densidade populacional média de <i>Ae. detritus</i> s.l., nas armadilhas tipo CDC, nos vários meses de colheita, por distrito.	71
Figura 38. Densidade populacional média de <i>Ae. detritus</i> s.l., nas colheitas IR, nos vários meses de colheita, por distrito.	71
Figura 39. Identificação do período potencial de transmissão de <i>D. immitis</i> em 2011, 2012 e 2013, para os 3 distritos estudados, e marcação dos dias onde foram capturados os mosquitos com PCR positivo para este parasita.	73
Figura 40. Electroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR do teste de sensibilidade para determinação do número mínimo de abdómen positivos (A+) possíveis de detetar num lote de 40 exemplares.	111
Figura 41. Electroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR do teste de sensibilidade para determinação do número mínimo de tórax+cabeça positivos (T+) possíveis de detetar num lote de 40 exemplares.	113
Figura 42. Electroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR do teste de sensibilidade para determinação da quantidade mínima de parasita capaz de ser detetada em 80ng de ADN de tórax+cabeça (T) e abdómen (A) de mosquito.....	115

Índice de Quadros e Tabelas

Quadro 1. Espécies encontradas como potenciais vetores de dirofilariose na Europa.....	18
Tabela 1. Número de fêmeas capturadas de cada espécie ou complexo de espécies e respectiva frequência relativa.....	44
Tabela 2. Número de fêmeas analisadas, por espécie ou complexo de espécies, e respectivos lotes.....	56
Tabela 3. Número de lotes só com T, só com A ou com T+A positivos para <i>D. immitis</i> , e respectiva percentagem, nos três distritos.....	58
Tabela 4. Taxa mínima de infecção por <i>D. immitis</i>	59
Tabela 5. Número de dias propícios ao completo desenvolvimento do parasita no mosquito, durante os anos 2011, 2012 e 2013, por distrito.....	72

Lista de abreviaturas, acrónimos e siglas

% - Porcento

1º - Primeiro

2ª - Segunda

2º - Segundo

4ª - Quarta

5ª - Quinta

A - Abdómen

ADN - Ácido desoxirribonucleico

Ae. - Género *Aedes*

An. - Género *Anopheles*

B - Controlo negativo

BF - Com refeição sanguínea recente (*Blood-fed*)

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

BSA - Albumina de soro bovino (*Bovine Serum Albumin*)

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*

cm - Centímetro

CO₂- Dióxido de carbono

Cs. - Género *Culiseta*

CTAB - Brometo de hexadeciltrimetilamonio

Cx. - Género *Culex*

D. - Género *Dirofilaria*

DDU - Unidades de desenvolvimento de *Dirofilaria* (*Dirofilaria Development Units*)

Di - Controlo positivo de PCR efetuado com ADN de verme adulto de *Dirofilaria immitis*

dNTP - Desoxirribonucliótidos fosfatados

DP - Desvio-padrão

Dr - Controlo positivo de PCR efetuado com ADN de sangue de cão infetado com *Dirofilaria repens*

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ENA - *European Nucleotide Archive*

f. - Forma

GDD - *Growing Degree Days*

GIS - Sistemas de informação geográfica (*Geographic Information Systems*)

gl - Graus de liberdade

GR - Grávida

h - Horas

IPMA - Instituto Português do Mar e da Atmosfera

IR - Colheita de mosquitos em repouso no interior (*Indoor Resting*)

ITS2 - Região do segundo espaçador do transcrito interno de ADN ribossomal (*Internal Transcribed Spacer region*)

km² - Quilometro quadrado (unidade de área)

L1 - Primeira forma de desenvolvimento de *Dirofilaria* spp. nas células dos tubos de Malpighi do mosquito

L2 - Forma de desenvolvimento de *Dirofilaria* spp., no lúmen dos tubos de Malpighi do mosquito, resultante da primeira muda

L3 - Forma infetante de *Dirofilaria* spp.

L5 - Adultos imaturos de *Dirofilaria* spp.

M - Marcador de peso molecular

mg - Miligrama

mg/ml - Miligramas por mililitro

ml - Mililitro

mm - Milímetros

mM - Milimolar (10^{-3} mol/Litro)

NaCl - Cloreto de sódio

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

ng - Nanogramas

Nº - Número

°C - Graus Celsius

Oc. - Género *Ochlerotatus*

p - Significância no teste estatístico

pb - Pares de bases

PCR - Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

rpm - Rotações por minuto

SG - Semi-grávida

T - Tórax+cabeça

T+A - Tórax+cabeça e abdómen

TAE - Tris-Acetato-EDTA

TE - Tris-EDTA

TMI - Taxa mínima de infeção

Tris - Tris(hidroximetil)aminometano

U/ μ l - Unidades por microlitro

UF - Sem refeição sanguínea (*Unfed*)

UV - Radiação Ultravioleta

μ l - Microlitro

μ M - Micromolar (10^{-6} mol/Litro)

1. Introdução

1. Introdução

1.1 Dirofilariose canina

1.1.1. A doença

A dirofilariose é uma doença causada por nemátodes do género *Dirofilaria* (Spirudida, Onchocercidae), transmitida por mosquitos (Diptera, Culicidae) e que afeta diversos mamíferos, nomeadamente cães e gatos domésticos. As principais espécies associadas a esta doença são *Dirofilaria (Dirofilaria) immitis* (Leidy, 1856) e *Dirofilaria (Nochtiella) repens* Railliet e Henry, 1911 (Simón *et al.* 2012), sendo que nos mamíferos (hospedeiros definitivos), os adultos alojam-se no ventrículo direito e vasos pulmonares, no caso da primeira espécie (Abraham 1988) e na hipoderme subcutânea, causando dirofilariose subcutânea, no caso da segunda (Rocconi *et al.* 2012).

A dirofilariose canina é um dos maiores problemas de saúde veterinária, com casos diagnosticados de doença em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (Vezzani & Carbajo 2006; Simón *et al.* 2012). Esta doença tem uma progressão crónica e, muitas vezes, assintomática mas, num estado avançado, os cães infetados por *D. immitis* podem apresentar, entre outros sintomas, *stress* respiratório, hemoptise, intolerância ao exercício físico e anorexia (McCall *et al.* 2008; Simón *et al.* 2012). O seu tratamento pode implicar complicações de saúde, como tromboembolismos (McCall *et al.* 2008; Simón *et al.* 2012), particularmente em cães com dirofilariose severa (Hoch & Strickland 2008), podendo a severidade da doença ser influenciada pelo número de parasitas, pela duração da mesma, pela resposta imunitária do hospedeiro e pelos seus níveis de exercício (Montoya *et al.* 1998; Hoch & Strickland 2008 *fidae* Vieira *et al.* 2014). Além disso, a libertação da bactéria gram-negativa simbiote *Wolbachia pipientis* (Rickettsiales, Rickettsiaceae) devida à morte do parasita (quer naturalmente, quer pelo tratamento), estimula mais ainda a resposta imunitária do hospedeiro, aumentando, conseqüentemente, a severidade da doença (Morchón *et al.* 2009 *fidae* Vieira *et al.* 2014).

As infeções por *D. repens* usualmente progridem assintomaticamente (Simón *et al.* 2012), podendo a sua manifestação passar por dermatite nodular multifocal (geralmente na face) ou dermatite papular pruriginosa (Scarzi 1995 *fidae* Simón *et al.* 2012). Contudo, outros sinais podem aparecer, como prurido, alopecia, vômitos e

edema, entre outros (Tarello 2010; Tarello 2011; Simón *et al.* 2012). Podem, ainda, ocorrer outros problemas de saúde devidos à localização ectópica do parasita em órgãos como o cérebro, o fígado, o baço ou os olhos (Grandi *et al.* 2007).

Em virtude das dificuldades associadas ao tratamento da doença, a prevenção da transmissão da mesma, através de medidas profiláticas, assume particular relevância. Esta profilaxia deve começar antes da primavera e alongar-se até ao final do outono, de forma a cobrir todo o período de transmissão, ou seja, de atividade dos mosquitos vetores (Genchi *et al.* 2007).

Os humanos são, para ambas as espécies de *Dirofilaria* referidas, um hospedeiro acidental, onde o parasita não se consegue desenvolver até ao estado adulto (*dead-end*), podendo causar inflamação nos tecidos ou nódulos pulmonares benignos que podem, inicialmente, ser identificados como tumores malignos (Muro *et al.* 1999; Theis *et al.* 2001). Em regiões hiperendémicas, parece existir um elevado contacto dos humanos com o parasita, havendo locais onde a seroatividade da população para antígeno de *Dirofilaria* ultrapassa os 20% (Tasić-Otašević *et al.* 2014). Na Europa o número de infeções humanas tem vindo a aumentar, com *D. repens* a ser o principal agente detetado (McCall *et al.* 2008; Ondriska *et al.* 2010; Tappe *et al.* 2014). Atualmente, a dirofilariose humana é considerada uma doença emergente em algumas regiões (Kramer *et al.* 2007).

1.1.2. Epidemiologia e distribuição geográfica

A dirofilariose é uma doença cosmopolita, de transmissão vetorial, sendo até há alguns anos considerada uma doença rara. Contudo, o aumento do número de casos nas últimas décadas resultou na sua classificação como zoonose emergente (Pampiglione & Rivasi 2001).

Apesar de *D. repens* se encontrar, exclusivamente, no Velho Mundo, *D. immitis* está presente em todo o mundo (Cancrini *et al.* 2006), pelo que a dirofilariose é uma doença de distribuição global (Figura 1).

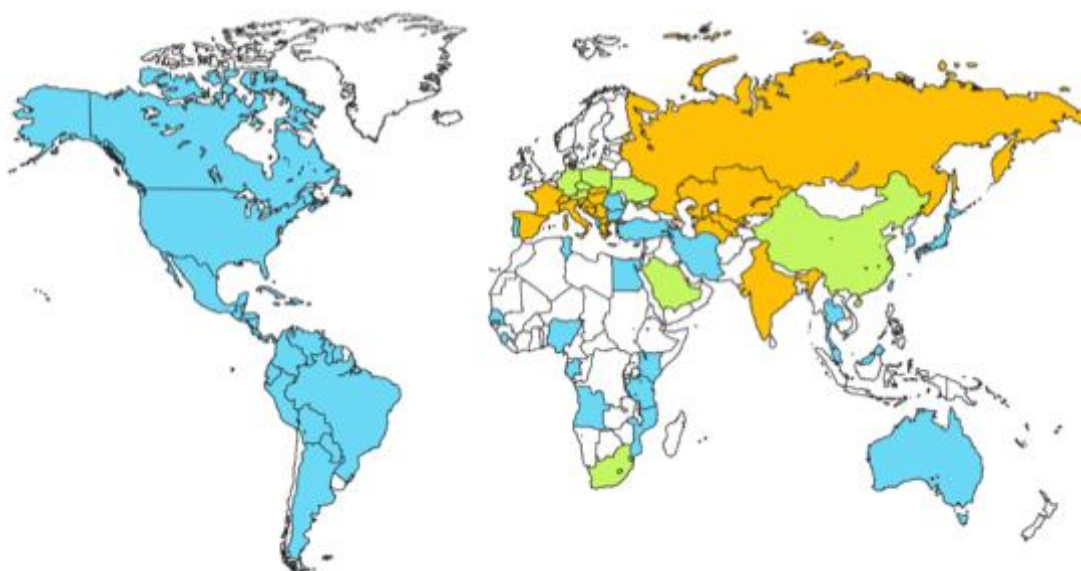


Figura 1. Distribuição geográfica da dirofilariose canina. Azul - países com casos de infeção por *D. immitis*; Verde - países com casos de infeção por *D. repens*; Laranja - países com casos de infeção por ambas as espécies (retirado de Simón *et al.* 2012).

No que respeita à Europa, esta doença tem vindo a alastrar por todo o continente (Genchi *et al.* 2005; Genchi *et al.* 2011; Otranto *et al.* 2013), sendo especialmente importante nos países do Mediterrâneo (Portugal, Espanha, sul de França, Itália, Grécia e Turquia) e na Europa de Leste. A sua maior área endémica encontra-se no vale do rio Po, no norte de Itália (Genchi *et al.* 2005), onde a prevalência pode ir dos 35% aos 80% em cães sem tratamento profilático (Genchi *et al.* 2007). De facto, as prevalências de

dirofilariose apresentam valores superiores junto a vales de rios e em zonas húmidas, uma vez que estas regiões são mais propícias à proliferação de mosquitos (OMS, 2004).

A temperatura, a precipitação e a humidade relativa são os três fatores climáticos que mais influenciam a prevalência de doenças transmitidas por vetores, entre as quais se encontra a dirofilariose (Genchi *et al.* 2009). A transmissão desta doença depende ainda da existência de número suficiente de cães com microfilárias na circulação periférica (nos gatos a microfilarémia é quase ausente ou de curta duração, pelo que o papel destes hospedeiros como reservatório é epidemiologicamente irrelevante), da presença de mosquitos suscetíveis e de um clima apropriado ao desenvolvimento do parasita no mosquito vetor (Medlock *et al.* 2007; Genchi *et al.* 2009). Assim, nas regiões temperadas, o clima conduz à ocorrência sazonal de transmissão de dirofilariose (Genchi *et al.* 2005), pois não só o período de atividade dos mosquitos depende da estação do ano, mas também o desenvolvimento de *Dirofilaria* spp. no mosquito depende, maioritariamente, da temperatura ambiente, cessando a partir de valores abaixo de aproximadamente 14°C (Fortin & Slocombe 1981 *fidae* Genchi *et al.* 2005). Da mesma forma que o desenvolvimento é interrompido a baixas temperaturas, é nas temperaturas mais elevadas, ou seja, no verão, que ocorre o pico de transmissão da doença (Genchi *et al.* 2005), não só no hemisfério norte, mas, também, no hemisfério sul (Vezzani & Carbajo 2006).

Nos últimos anos, alterações climáticas, o transporte mais frequente de cães pela Europa e, ainda, a dispersão de espécies vetorais da doença têm conduzido à expansão da sua distribuição geográfica (Genchi *et al.* 2009). Em Itália, e apesar da aplicação de medidas profiláticas, a dirofilariose alastrou para locais onde, anteriormente, não ocorria (Pietrotrobelli *et al.* 1998 *fidae* Cancrini *et al.* 2007). Além dos fatores referidos anteriormente, Romi (2001) *fidae* Cancrini *et al.* (2007) considera que esta expansão poderá estar relacionada com alterações no padrão de transmissão da doença, nomeadamente, no número de espécies vetorais envolvidas, na densidade das suas populações e no seu padrão de alimentação, longevidade e sazonalidade. Assim, o controlo da dirofilariose, bem como o de outras doenças com transmissão vetorial, não pode passar só pela atuação ao nível do parasita e do seu hospedeiro definitivo, mas tem de passar, também, por uma atuação ao nível dos seus vetores.

1.1.3. Em Portugal

Num estudo epidemiológico realizado no nosso País, foi encontrada uma prevalência de dirofilariose canina entre os 12% e os 17% em Portugal continental e 30% na ilha da Madeira (Araújo 1996). Mais recentemente, dirofilariose canina causada por *D. immitis* foi reportada, com diferentes prevalências, em diversos locais: 2,1% em Viana do Castelo (Vieira *et al.* 2014), 6,8% em Aveiro (Cardoso *et al.* 2012; Vieira *et al.* 2014), 8,8% e 13,8% em Coimbra (Cardoso *et al.* 2012; Alho *et al.* 2014a, respetivamente), 27,3% na Figueira da Foz (Vieira *et al.* 2014), 13,2% em Santarém (Alho *et al.* 2014a), 24,8% em Setúbal (Alho *et al.* 2014a) e 40% na Madeira (Cardoso *et al.* 2012). Até ao momento, não há registo da ocorrência de *D. repens* em Portugal.

Para além da dirofilariose canina, existem em Portugal registos de dirofilariose humana, nomeadamente, um caso de dirofilariose ocular (Rombert *et al.* 1992) e dois casos identificados como sendo de *D. immitis* após a remoção de nódulos pulmonares (Araújo 1996).

Apesar da importância do conhecimento dos vetores de *Dirofilaria* spp. no esclarecimento do padrão local de transmissão da doença, muito poucos estudos têm sido realizados neste âmbito. Em 1983, foram encontradas larvas de *Dirofilaria* sp. em *Culex theileri* Theobald, 1903 na área da Comporta, Alcácer do Sal (Ribeiro *et al.* 1983) e em 1993 foram encontradas larvas de *Dirofilaria* sp. em *Anopheles atroparvus* Van Thiel, 1927, *Aedes caspius* (Pallas, 1771) e *Culex pipiens* (Linnaeus, 1758) na região de Castro Marim, apresentando as 2 últimas espécies larvas L3 (Ramos *et al.* 1993). Mais recentemente, novamente *Cx. theileri* foi encontrada infetada na ilha da Madeira (Santa-Ana *et al.* 2006).

Um estudo realizado recorrendo a um modelo de previsão para a transmissão de *D. immitis* (Figura 2) mostra que, em Portugal continental, esta deverá ocorrer entre os dias 21 de maio e 31 de outubro (Genchi *et al.* 2005).

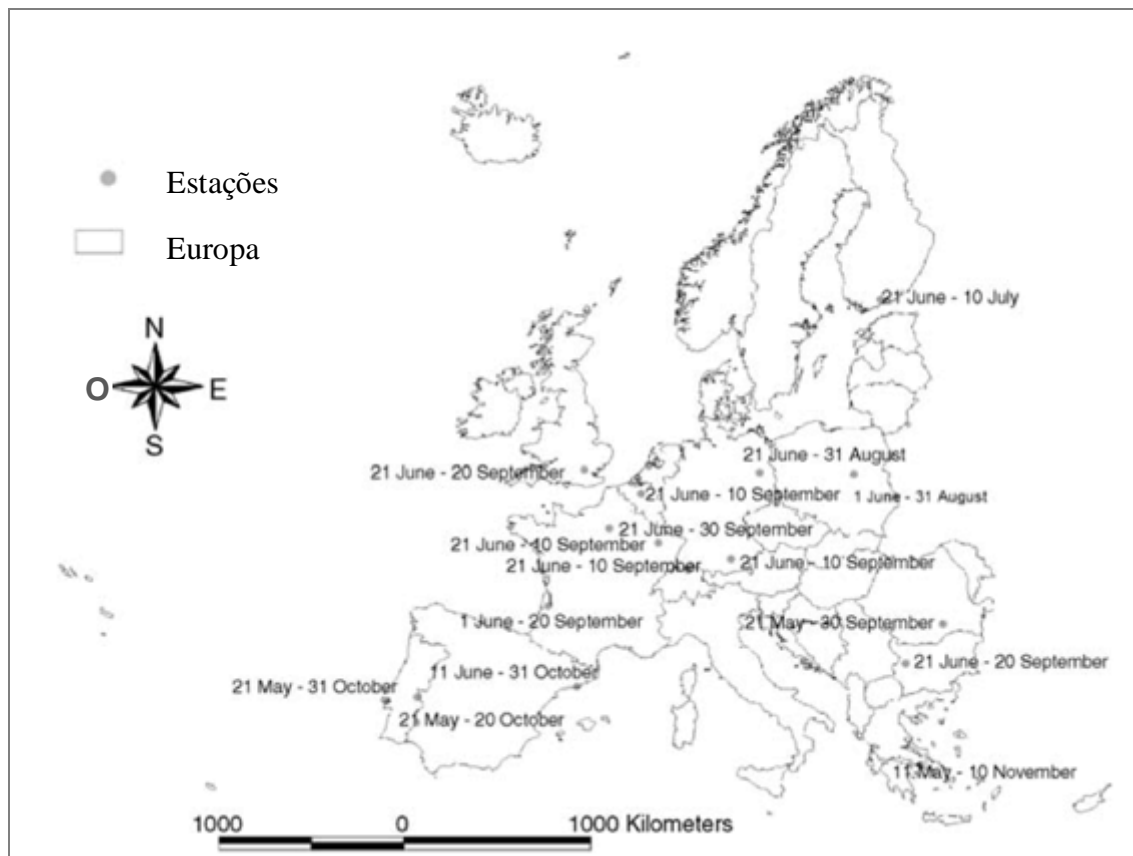


Figura 2. Previsão do período de transmissão de *D. immitis*, em alguns países europeus, através de modelo baseado no sistema de *growing degree days* (retirado de Genchi *et al.* 2005).

1.1.4. Modelos de previsão da transmissão de dirofilariose

As alterações climáticas são consideradas um problema global, com possível impacto em saúde humana e animal. Um fator que se considera poder estar na base destas alterações nos padrões climáticos globais é o aquecimento global, que é definido como o aumento da temperatura média na atmosfera junto à superfície terrestre (Bernardi 2008).

Tal como referido anteriormente (1.1.2), a temperatura, a precipitação e a humidade relativa são os três principais fatores que determinam a abundância de mosquitos e a prevalência das doenças por eles transmitidas, como é o caso da dirofilariose (Genchi *et al.* 2009). Neste contexto, a temperatura é importante, não só porque o desenvolvimento dos mosquitos depende desta, sendo a temperatura ótima para o desenvolvimento de mosquitos nas regiões temperadas entre os 25 e 27°C (Monteiro *et al.* 2007; Swain *et al.* 2008), mas também porque influencia o desenvolvimento do parasita no seu mosquito vetor (Kalluri *et al.* 2007). Desta forma, quaisquer alterações neste parâmetro influenciarão a epidemiologia da doença, sendo de extrema relevância tentar prever as suas consequências. A previsão da ocorrência de uma doença de transmissão vetorial e da sua sazonalidade deve, portanto, basear-se em características climáticas e ambientais de uma dada área e, ainda, nos requisitos climáticos e ambientais das espécies de parasitas e seus vetores (Cringoli *et al.* 2005; Rinaldi *et al.* 2006).

Os modelos de previsão baseados no clima, geralmente utilizam o conceito de *growing degree days* (GDD), em que o primeiro dia de desenvolvimento é considerado quando temperatura média for, no mínimo, 1°C acima da temperatura limite para o desenvolvimento do parasita no vetor (período de incubação extrínseca). Vários sistemas baseados neste conceito têm sido desenvolvidos para várias doenças, incluindo a dirofilariose (Genchi *et al.* 2005). Os modelos utilizados no âmbito desta zoonose têm em conta que o desenvolvimento completo de *D. immitis* no mosquito requer 8 a 9 dias a 30°C (em *Aedes vexans* (Meigen, 1830), *Aedes triseriatus* (Say, 1823), *Aedes trivittatus* (Coquillett, 1902) e *Anopheles quadrimaculatus* Say, 1824), aumentando para 10 a 14 dias a 26°C, 17 dias a 22°C e 29 dias a 18°C (Fortin & Slocombe 1981 *fidæ* Genchi *et al.* 2005). Neste mesmo trabalho, os autores descrevem que o período de incubação extrínseca de *Dirofilaria* spp. pode ser definido pelo número de unidades de

desenvolvimento de *Dirofilaria* (DDU). Estas unidades são calculadas como a diferença entre a temperatura média diária e o limite de temperatura necessário para o desenvolvimento do parasita, 14°C. Estes cálculos são necessários para determinar até que ponto um mosquito suscetível infetado num dia terá as condições ambientais necessárias para sustentar o desenvolvimento completo do parasita. Para tal, é admitido que para um mosquito se tornar infetante, são necessários 130DDU, numa vida máxima do mosquito de 30 dias (Slocombe *et al.* 1989 *fidæ* Genchi *et al.* 2005; Knight & Lok 1998 *fidæ* Genchi *et al.* 2005), ou seja, só se a soma das DDU de 30 dias consecutivos, independentemente da temperatura média de alguns desses dias ser abaixo de 14°C, for igual ou superior a 130DDU é que é admitida a possibilidade do mosquito infetado se tornar um mosquito infetante (Genchi *et al.* 2005; Morchón *et al.* 2009; Venco *et al.* 2011; Sassnau *et al.* 2014).

Os modelos matemáticos que permitem estudar e fazer previsões relativas à transmissão de uma dada doença são cada vez mais usados, sendo especialmente úteis em estudos epidemiológicos de doenças com fortes determinantes ambientais. Muitas vezes estes modelos são associados à tecnologia de sistemas de informação geográfica (GIS), permitindo obter mapas preditivos para o período e locais de risco de transmissão (como o da Figura 2 para a dirofilariose), assim como, determinar os melhores períodos para a aplicação de profilaxia numa determinada região.

1.2 O parasita

1.2.1 Sistemática e morfologia

Os parasitas causadores da dirofilariose canina foram descritos pela primeira vez em 1856 por Leidy, que lhes atribuiu o nome de *Filaria immitis*. Mais tarde, em 1911, Railliet e Henry criaram o género *Dirofilaria*.

De acordo com a classificação sistemática, revista por Anderson (2000), os parasitas do género *Dirofilaria* pertencem à Classe Nematoda, Ordem Spirurida, Superfamília Filarioidea e Família Onchocercidae.

As características de morfologia mais significativas neste género são a ausência de lábios na boca dos adultos e a estriação transversal da sua cutícula. Neste género ocorre elevado dimorfismo sexual, com as fêmeas a apresentarem uma extremidade posterior arredondada, localizando-se a vulva após o esófago, enquanto os machos têm a parte posterior em espiral, numerosas papilas caudais e, ainda, duas espículas diferentes. Relativamente às formas imaturas presentes nos hospedeiros vertebrados (microfilárias), estas não apresentam bainha e a extremidade posterior é afilada (Canestri Trotti *et al.* 1997; Manfredi *et al.* 2007).

Este género está dividido em 2 subgéneros. O subgénero *Dirofilaria*, onde se inclui *D. immitis*, tem adultos alongados, esbranquiçados e filiformes (Figura 3), sem cristas cuticulares, à exceção da parte ventral da extremidade posterior dos machos, cujas papilas da zona posterior são ligeiramente assimétricas em distribuição e número. Por seu lado, no subgénero *Nochtiella*, ao qual pertence *D. repens*, os adultos são mais pequenos, com cristas cuticulares longitudinais e as papilas da zona posterior dos machos são distintamente assimétricas em distribuição e número (Canestri Trotti *et al.* 1997; Manfredi *et al.* 2007).



Figura 3. Adultos de *D. immitis*. Fêmea (em cima) e macho (em baixo) (retirado de Manfredi *et al.* 2007).

1.2.2. Biologia e ciclo de vida

O ciclo de vida, quer de *D. immitis*, quer de *D. repens*, está esquematicamente apresentado na Figura 4.

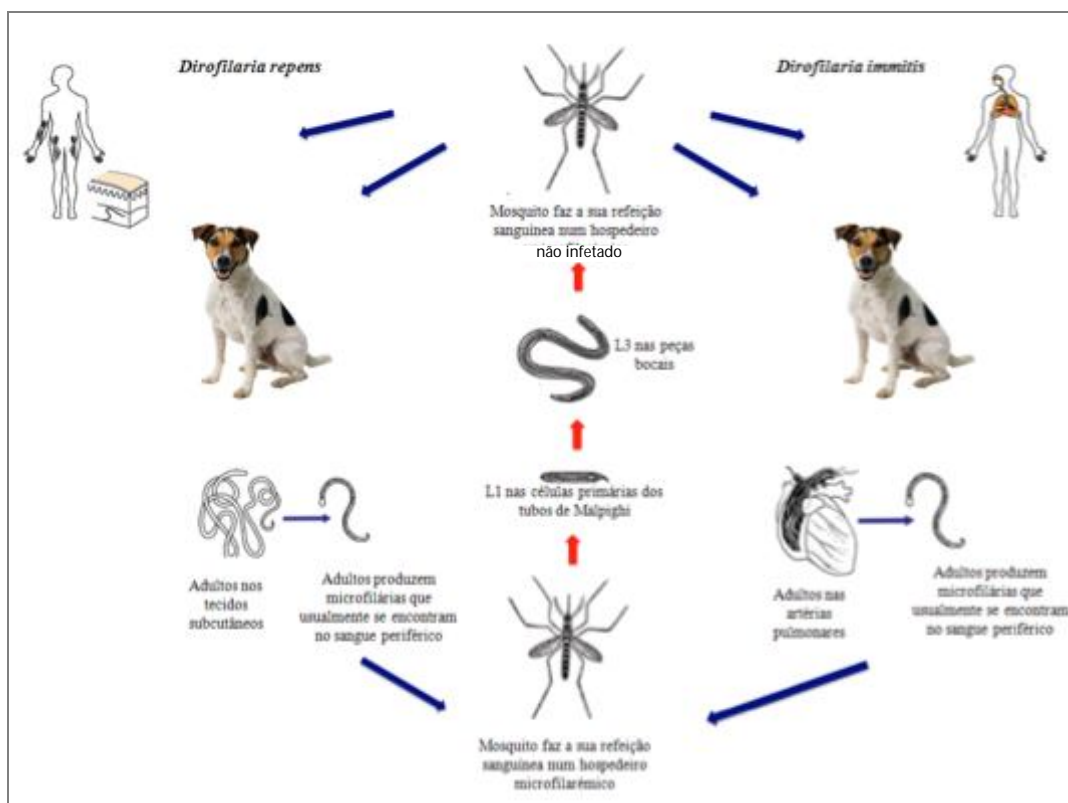


Figura 4. Ciclo de vida de *D. repens* e *D. immitis* (adaptado de CDC 2012).

Cerca de 6 meses depois de um hospedeiro vertebrado ter sido infectado (período de pré-patência), através da picada de um mosquito vetor, as fêmeas de *Dirofilaria* spp. libertam na circulação sanguínea ovos com microfilárias (0,03cm) completamente desenvolvidas, originadas por reprodução sexuada, sendo por isso consideradas ovovivíparas (Manfredi *et al.* 2007).

Quando uma fêmea de mosquito suscetível faz a sua refeição sanguínea nesse hospedeiro, as microfilárias que se encontram em circulação são também ingeridas, permanecendo cerca de 24 horas no estômago do mosquito (Figura 5). Posteriormente, migram para os tubos de Malpighi alojando-se no citoplasma das células primárias (Bradley *et al.* 1984 *fidae* Abraham 1988). É neste local que a microfilária se

transforma em L1, tornando-se mais pequena e adquirindo o formato “em salsicha” (*sausage*). A larva L1 atravessa depois a parede celular, alojando-se no lúmen dos tubos de Malpighi, onde sofre as primeira e segunda mudas, passando ao segundo (L2) e terceiro (L3) estados larvares, respetivamente. Neste último estado larvar, que é o estado infetante para o vertebrado, migram, posteriormente, dos tubos de Malpighi para a bainha labial das peças bucais do mosquito, através do hemocélio (Cancrini & Gabrielli 2007). Modelos de previsão baseados em condições climáticas mostram que, tal como referido anteriormente (1.1.4), o desenvolvimento completo de *D. immitis* no hospedeiro invertebrado demora 8 a 9 dias a 30°C, 10 a 14 dias a 26°C, 17 dias a 22°C e 29 dias a 18°C em *Ae. vexans*, *Ae. triseriatus*, *Ae. trivittatus* e *An. quadrimaculatus* (Fortin & Slocombe 1981 *fidae* Genchi *et al.* 2005).

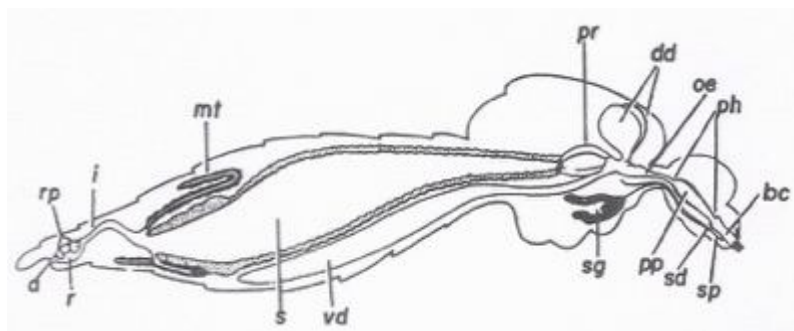


Figura 5. Esquema do aparelho digestivo de um mosquito fêmea (retirado de Rodhain & Perez 1985). a – ânus; bc – cavidade bucal; dd – divertículos dorsais; i – intestino posterior; mt – tubos de Malpighi; oe – esófago; ph – faringe; pp – bomba faríngea; pr – proventrículo; r – reto; rp – papilas retais; s – estômago; sd – canal salivar; sg – glândulas salivares; sp – bomba salivar; vd – divertículo ventral.

Na maioria das espécies de mosquitos, acima de 23°C, o ciclo gonotrófico completa-se em 48h, de modo a que cada 2-3 dias há procura de novo hospedeiro para efetuar nova refeição sanguínea (Almeida 2011). Quando um mosquito infetante faz uma nova refeição, as L3 deslizam pelo aparelho bucal durante a refeição e penetram na ferida da picada. Se o hospedeiro vertebrado for suscetível ocorre potencialmente a

transmissão do parasita. Neste novo hospedeiro, as L3 penetram nos tecidos conectivos e migram para os músculos, onde sofrem as terceira e quarta mudas, dando origem a adultos imaturos (L5), 90 a 100 dias após a infecção. Estes migram para as artérias pulmonares, presumivelmente pela circulação venosa (Anderson 2000) e penetram na jugular, ou em outras veias, através das quais atingem o coração, onde maturam e crescem até ao seu tamanho máximo (cerca de 30cm) e onde, posteriormente, copulam (Manfredi *et al.* 2007). Assim, os vermes adultos de *D. immitis* encontram-se, quer nas artérias pulmonares, quer no coração do hospedeiro definitivo (Figura 6A). Os vermes adultos podem viver mais de 7 anos no seu hospedeiro definitivo, enquanto as suas microfilárias vivem até 2 anos (Alho *et al.* 2014b).

O ciclo de *D. repens* é muito semelhante ao descrito acima para *D. immitis*, ocorrendo diferenças apenas durante o desenvolvimento no hospedeiro definitivo. Neste caso, as larvas não têm longas migrações, atingindo a maturidade nos tecidos subcutâneos (Figura 6B), e causando, tal como já foi referido, dirofilariose subcutânea.

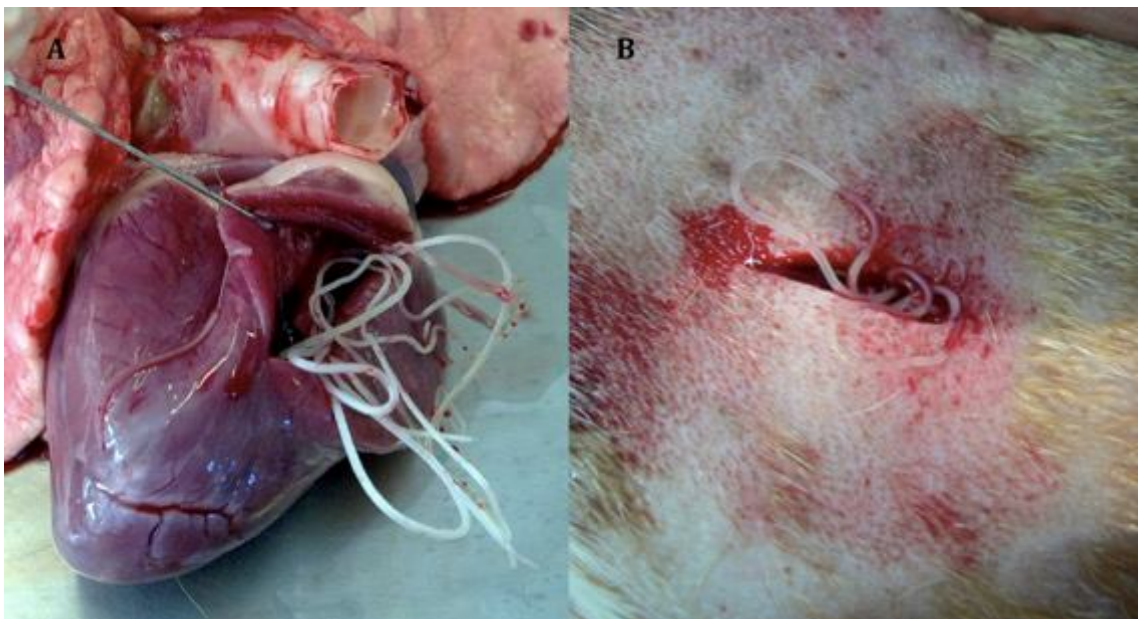


Figura 6. Localização do parasita adulto no hospedeiro definitivo. A - macho e fêmea de *D. immitis* em coração de cão (retirado de Simón *et al.* 2012); B - adulto de *D. repens* num nódulo subcutâneo aberto em cão (retirado de Simón *et al.* 2012: cortesia de Sergey Kartashov, Rostov, Russia).

1.3 Vetores de dirofilariose canina

À luz do conhecimento atual, espécies de mosquito, ou culicídeos, são os únicos vetores de dirofilariose canina. Estes pertencem ao Filo Arthropoda, Classe Insecta, Ordem Diptera, Subordem Nematocera, Família Culicidae Meigen, 1830 (Almeida 2011). A Família Culicidae tem mais de 3500 espécies espalhadas por todo o mundo, sendo que em Portugal foram registadas, até ao momento, 41 (Almeida 2011). Esta Família subdivide-se nas Subfamílias Toxorhynchitinae, Anophelinae e Culicinae. Apenas nas duas últimas Subfamílias as fêmeas são hematófagas, possuindo uma probóscide adaptada à perfuração/sucção, donde só estas têm importância na transmissão de doenças, nomeadamente dirofilariose. Embora todas as fêmeas de mosquito se alimentem ainda de sucos de plantas e/ou frutos, esta constitui a alimentação exclusiva dos adultos de Toxorhynchitinae e dos machos das outras duas Subfamílias (Cancrini & Gabrielli 2007; Almeida 2011).

Os culicídeos adultos medem entre 2 e 10mm de comprimento, apresentam olhos compostos, antenas, probóscide e patas alongadas, escamas no corpo e nas nervuras e margens das asas, que apresentam a 2^a, 4^a e 5^a nervuras bifurcadas, e apenas oito dos dez segmentos abdominais são visíveis. O seu ciclo de vida decorre em dois ambientes distintos: o aéreo (adultos) e o aquático (ovo e formas imaturas), Figura 7. Cada espécie tem um intervalo ótimo de temperatura para o seu desenvolvimento, sendo que em condições desfavoráveis podem entrar em diapausa (hibernação ou estivação). Esta pode ocorrer no ovo, na larva ou no adulto, dependendo das espécies (Almeida 2011).

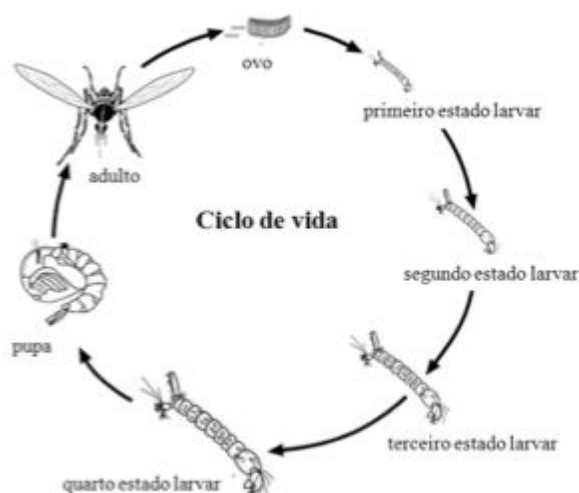


Figura 7. Ciclo de vida generalizado dos membros da família Culicidae (adaptado de Hill & MacDonald 2008).

Na procura de um possível hospedeiro, as fêmeas de culicídeos são atraídas por fatores como o dióxido de carbono (CO_2) produzido pelo hospedeiro, o odor e/ou temperatura corporal deste (Cancrini & Gabrielli 2007). O comportamento de picada apresenta diferentes padrões, dependendo da espécie, sendo umas ativas durante a noite, outras durante o dia e outras apresentando 2 picos de atividade. Estes comportamentos não são rígidos, mas, no caso de espécies vetoras, o comportamento mais comum de uma espécie resulta da coevolução desta com os parasitas que transmite (Cancrini & Gabrielli 2007). Contudo, este não é o único fator a influenciar o comportamento do mosquito. Outros fatores, muitos deles característicos do próprio indivíduo, também podem modular a sua ação, por exemplo, longos períodos de privação de refeição sanguínea podem tornar os seus padrões de atividade mais intensos (Klowden 1996 *et al.* Cancrini & Gabrielli 2007).

As espécies de mosquitos podem ser consideradas endofágicas ou exofágicas, consoante preferem realizar a refeição sanguínea no interior ou no exterior de habitações ou abrigos de animais, respetivamente. Podem, também, ser endofílicas, quando a maioria do ciclo gonotrófico decorre no interior das habitações ou abrigos, ou exofílicas, quando este decorre no exterior das mesmas (Cancrini & Gabrielli 2007). Estas diferenças de comportamento podem ter reflexos ao nível epidemiológico de uma doença, pois vão influenciar, por exemplo, a temperatura à qual ocorre o

desenvolvimento do parasita no mosquito ou a sua exposição a predadores. Existe ainda uma outra diferença que se prende com a necessidade de realizar refeições sanguíneas para que ocorra oviposição. Neste contexto, os mosquitos podem ser anautogénicos ou autogénicos, consoante a refeição sanguínea seja, respetivamente, essencial ou não para a oviposição. Assim, mosquitos anautogénicos terão uma maior relevância em doenças de transmissão vetorial.

Espécies do género *Culex* e *Ochlerotatus* foram reportados como os principais vetores de *Dirofilaria* spp. em Itália e outros países da Europa (Cancrini *et al.* 2003; Cancrini *et al.* 2007; Otranto *et al.* 2009). Contudo, várias espécies, pertencentes aos géneros *Culex*, *Aedes*, *Ochlerotatus*, *Anopheles*, *Armigeres*, *Coquilletidia* e *Mansonia* serão capazes de transmitir dirofilariose (Cancrini *et al.* 1995; Pampiglione & Rivasi 2000; Vezzani & Carbajo 2006; Vezzani *et al.* 2011). Reinert (2000) elevou a género o subgénero *Ochlerotatus* do género *Aedes*. No entanto, não sendo esta alteração consensual, optou-se neste trabalho pela nomenclatura anterior. No Quadro 1 encontram-se as espécies descritas como potenciais vetores de dirofilariose na Europa.

Quadro 1. Espécies encontradas como potenciais vetores de dirofilariose na Europa.

Espécie	Local	Referência
<i>Aedes albopictus</i>	Itália	(Cancrini <i>et al.</i> 2003) (Cancrini <i>et al.</i> 2007)
<i>Aedes caspius</i>	Portugal	(Ramos <i>et al.</i> 1993)
<i>Aedes vexans</i>	Turquia	(Biskin <i>et al.</i> 2010) (Yildirim <i>et al.</i> 2011)
<i>Anopheles maculipennis</i> s.l.	Itália	(Cancrini <i>et al.</i> 2006)
<i>Coquilletidia richiardii</i> *	Itália	(Cancrini <i>et al.</i> 2006)
<i>Culex pipiens</i>	Espanha	(Morchón <i>et al.</i> 2007)
	Itália	(Cancrini <i>et al.</i> 2006) (Cancrini <i>et al.</i> 2007) (Capelli <i>et al.</i> 2013)
	Portugal	(Ramos <i>et al.</i> 1993)
	Turquia	(Yildirim <i>et al.</i> 2011)
<i>Culex theileri</i>	Espanha	(Morchón <i>et al.</i> 2011)
	Portugal	(Santa-Ana <i>et al.</i> 2006)

* De acordo com dados do autor, precisa de mais estudos.

Tal como já foi referido (1.1.3), os estudos relativos aos vetores de dirofilariose canina em Portugal são escassos, sendo *Cx. theileri*, *Cx. pipiens* e *Ae. caspius* as espécies referenciadas neste sentido (Ribeiro *et al.* 1983; Ramos *et al.* 1993; Santa-Ana *et al.* 2006). Dada a prevalência desta parasitose em canídeos, é fundamental o conhecimento de quais os seus vetores em Portugal para, em conjunto com a sua bioecologia e distribuição geográfica, corretamente avaliar o risco de transmissão a animais e humanos e, ainda, seleccionar as medidas de profilaxia e controlo apropriadas.

1.4. Interação parasita - hospedeiro invertebrado

Assim como referido anteriormente (1.2.2), parte do ciclo de vida do parasita causador de dirofilariose ocorre num hospedeiro invertebrado. Contudo, o facto deste se encontrar parasitado afeta, além da sua fecundidade (Christensen 1981; Beerntsen *et al.* 2000; Christensen *et al.* 2005), também a sua sobrevivência (Kartman 1953; Intermill 1973). O aumento de mortalidade nos mosquitos infetados coincide com momentos cruciais do ciclo de vida do parasita, nomeadamente, a sua migração do estômago para os tubos de Malpighi e, posteriormente, a saída das larvas infetantes deste órgão para o hemocélio (Kershaw *et al.*, 1953 *fidae* Abraham 1988). Em consequência, vários são os mecanismos de defesa desenvolvidos pelos mosquitos. Contudo, é de referir que, ao contrário do que acontece nos vertebrados, os mosquitos e outros invertebrados não têm mecanismos imunitários de resposta adaptativa, tendo somente resposta inata contra moléculas estranhas ao seu organismo. De uma forma geral, os mosquitos eliminam os agentes patogénicos através de três ações distintas: fagocitose mediada por células, melanização e lise, sendo que, cada uma delas é desencadeada por recetores responsáveis pelo reconhecimento de determinados padrões, e os fatores que levam à morte do agente podem ser componentes celulares ou humorais (Hillyer 2010).

A resposta do hospedeiro invertebrado à invasão do parasita começa logo que há o primeiro contacto entre os dois organismos o que, no caso específico da dirofilariose, ocorre quando a fêmea de mosquito efetua a sua refeição sanguínea num hospedeiro definitivo microfilarémico. Em algumas espécies de mosquito, a primeira barreira encontrada pelas microfilárias não corresponde a nenhum tipo de resposta imunitária mas sim, a uma barreira mecânica, a armadura cibarial (Figura 8), cuja ação constitui

uma forma eficiente de provocar danos nas microfilárias, aquando da sua passagem na faringe. O abrir e fechar desta estrutura, mais ou menos desenvolvida e com número e desenvolvimento variável de dentes consoante a espécie de mosquito em questão, pode provocar graves lesões na cutícula do parasita, conduzindo eventualmente à sua morte (Coluzzi & Trabucchi 1968 *fidæ* Cancrini & Gabrielli 2007).

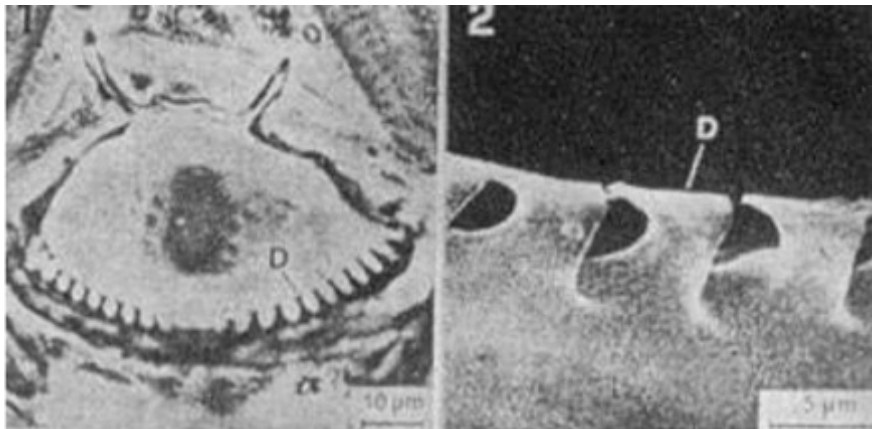


Figura 8. Armadura cibarial de *Cx. pipiens*. 1 - Corte transversal da válvula da faringe com dentes evidentes (D); 2- Detalhe dos dentes na margem da armadura cibarial (retirado de Coluzzi *et al.* 1981).

Os parasitas que conseguem sobreviver a esta barreira, atingem o intestino médio em conjunto com a refeição sanguínea do mosquito. Aqui encontra-se outro fator que influencia a capacidade de um mosquito se tornar vetor: a velocidade de coagulação da refeição sanguínea. Ocorrendo uma coagulação muito rápida, o parasita pode ficar preso e não conseguir migrar para os tubos de Malpighi (Frizzi & Pedrotti 1957 *fidæ* Cancrini & Gabrielli 2007), pelo que, mosquitos que produzam substâncias anticoagulantes serão mais recetivos à infeção. Contudo, uma refeição sanguínea muito fluida também não é benéfica para a infeção, uma vez que conduz a uma concentração da mesma por eliminação do excesso de água plasmática com simultânea eliminação de microfilárias antes que estas consigam atravessar a parede do intestino médio e penetrar nos tubos de Malpighi (Nayar & Sauermen 1975 *fidæ* Abraham 1988; Ando 1984 *fidæ* Abraham 1988).

Posteriormente, o parasita migra para as células dos tubos de Malpighi, onde atinge a forma L1 e completa o seu desenvolvimento até ao estado L3 no lúmen deste órgão, o que poderá ser uma estratégia para se evadir aos mecanismos de defesa do mosquito, que não atuam nos seus próprios tecidos (Castillo *et al.* 2011). Mais tarde, a forma infetante de *Dirofilaria* spp. desloca-se pelo hemocélio até atingir a cabeça, ficando sujeita às defesas do hospedeiro invertebrado (Bartholomay 2014). Entre estas estão a melanização, a fagocitose e a encapsulação por hemócitos (Christensen *et al.* 2005).

A melanização nos insetos, em geral, é uma resposta que se manifesta rapidamente nas superfícies dos agentes patogénicos que invadem a cavidade corporal, sendo um tipo de fagocitose normal que envolve uma interação entre hemócitos, formando estruturas multicelulares nas quais os parasitas eucariotas ficam sequestrados (Christensen *et al.* 2005). Porém, nos mosquitos adultos, como o número de hemócitos é limitado, a melanização ocorre sem estas estruturas multicelulares, sendo, por isso, uma resposta humoral, Figura 9 (Christensen *et al.* 2005). O desenvolvimento dos ovos do mosquito adulto e a melanização parecem ser processos que envolvem os mesmos substratos, pelo que, a tentativa de se proteger da invasão do parasita pode levar à redução da sua fecundidade (Ferdig *et al.* 1993 *fidae* Christensen *et al.* 2005).



Figura 9. Microfilária de *D. immitis* completamente melanizada no hemocélio de um mosquito da espécie *Armigeres subalbatus* - escala 15 μ m (retirado de Christensen *et al.* 2005).

Além destes fatores biológicos existem outras características bioecológicas, intrínsecas do hospedeiro invertebrado, importantes na transmissão de filárias, como o seu comportamento na busca de hospedeiro, a capacidade de dispersão a partir do local onde se reproduz, a distribuição geográfica, o pico de atividade, o número de gerações anuais, o tamanho populacional e a ocorrência durante o ano (Bocková *et al.* 2013). É importante realçar que o comportamento mais comum de uma espécie de mosquito vetora resulta da coevolução desta com os parasitas que transmite (Cancrini & Gabrielli 2007), pelo que todos os fatores que influenciam a relação do parasita com o seu hospedeiro invertebrado tendem a, no caso de vetores eficientes, encontrar um balanço entre a sobrevivência e reprodução quer do parasita, quer do hospedeiro.

2. Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Portugal é um país endémico para a dirofilariose canina e, para ser possível aplicar medidas de controlo apropriado, é necessário compreender e conhecer a epidemiologia e o padrão de transmissão desta doença. Neste contexto, a identificação das espécies vetorais envolvidas na transmissão de dirofilariose numa área endémica é a chave para um correto entendimento da sua dinâmica de transmissão, tanto para animais, como para humanos. Assim, o objetivo principal deste trabalho foi identificar os mosquitos vetores de dirofilariose canina, em 3 distritos de Portugal continental.

2.2. Objetivos específicos

1. Identificar as espécies de mosquitos capturadas nos 3 distritos;
2. Avaliar a densidade das diferentes espécies por ano e distrito;
3. Detetar ADN de *Dirofilaria* spp. nos mosquitos capturados;
4. Distinguir mosquitos infetados de mosquitos potencialmente infetantes;
5. Calcular a taxa mínima de infeção;
6. Relacionar as temperaturas médias existentes durante o período de colheitas, com a possibilidade do desenvolvimento do parasita no mosquito.

3. Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1. Colheita de mosquitos

3.1.1. Área de estudo

As áreas alvo deste estudo foram os distritos de Coimbra, Santarém e Setúbal (Figura 10), endémicos para dirofilariose e com condições ecológicas favoráveis ao desenvolvimento de populações de mosquitos.



Figura 10. Mapa de Portugal com os distritos de Coimbra, Santarém e Setúbal assinalados (desenhado em computador pela autora).

O distrito de Coimbra, com uma área total de 3972 km², é circundado pelos distritos de Aveiro, Viseu, Guarda, Castelo Branco e Leiria e, ainda, pelo oceano Atlântico a Oeste. Este distrito, abrange a rede hidrográfica do rio Mondego e apresenta zonas montanhosas e com vales profundos, de clima mais frio, e zonas litorais mais planas de clima temperado. Quanto às atividades socioeconómicas, a indústria tem um importante peso, em particular nas áreas urbanas, sendo que a exploração florestal e

agrícola, especialmente a produção de vinho e milho, são também relevantes (Infopédia 2014a).

Por seu lado, o distrito de Santarém encontra-se no vale do rio Tejo e possui uma área de cerca de 6700 km². É limitado pelos distritos de Castelo Branco, Portalegre, Évora, Leiria e Lisboa, não tendo qualquer contato com o oceano Atlântico. Os solos são férteis e, em consequência, predominam atividades económicas a eles associadas, como a pecuária e a agricultura, nomeadamente a produção de vinho, azeite, frutas e cereais (Infopédia 2014b).

O distrito de Setúbal, localizado a sul do rio Tejo, engloba o estuário do rio Sado. Tendo uma área de 5067 km², é circundado pelos distritos de Santarém, Beja e Évora, sendo toda a sua zona oeste banhada pelo oceano Atlântico. Este distrito, além de uma importante tradição industrial nas zonas urbanas, possui uma vasta atividade agrícola, com predominância de áreas associadas à produção de cereais e produtos hortofrutícolas, olival e vinhas (Infopédia 2014c) e, ainda, atividade florestal relacionada com a vasta área de pinhal e montado.

Os vales dos três rios referidos, Mondego, Tejo e Sado, são locais com as mais vastas áreas de cultura de arroz em regadio em Portugal (Almeida & Marques 2013), apresentando condições favoráveis à criação de mosquitos. Por outro lado, existem ainda nestes distritos outras zonas húmidas, que não agrícolas de regadio, tais como o Paul do Taipal, Paul de Madriz, Paul da Arzila e o estuário do Mondego no distrito de Coimbra, o Paul do Boquilobo e o estuário do Tejo no distrito de Santarém e, ainda, as Lagoas de Santo André, Lagoa de Albufeira e o estuário do Sado no distrito de Setúbal (The Ramsar Convention on Wetlands 2013) que, pelas suas características bioecológicas particulares, também elas apresentam excelentes condições para a proliferação de várias espécies de mosquitos.

3.1.2. Amostragem culicideológica

A captura de mosquitos, dirigida às formas adultas, decorreu durante 2 anos e em três estações do ano distintas: verão (julho de 2011 e 2012), outono (novembro de 2011 e outubro e novembro de 2012) e primavera (abril e maio de 2012 e maio de 2013), em canis, suas imediações ou arredores. Foram prospetados quatro locais no distrito de Coimbra, seis no de Santarém e quatro no de Setúbal, não sendo aqui concretamente referenciados por motivos de confidencialidade. Os mosquitos em período de atividade foram capturados recorrendo a armadilhas luminosas tipo CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) com gelo seco como atratante adicional, a funcionar no mínimo entre as 18h e as 7h. Os mosquitos em repouso foram capturados durante a manhã, no interior das instalações e/ou abrigos (IR), com recurso a aspiradores mecânicos, sendo anotada a duração da colheita. Procedeu-se à caracterização dos diferentes locais de colheita através do registo de, nomeadamente, tipo de biótopo envolvente, características da instalação ou abrigo, espécies de vertebrados presentes e respetiva abundância e, quando necessário, da ocorrência de situações climáticas adversas no momento da colheita, tais como precipitação e/ou ventos fortes.

Após a colheita, os mosquitos capturados foram transportados vivos com acesso a solução de sucrose a 10%. No primeiro ano (julho de 2011 a maio de 2012), os mosquitos vivos à chegada ao laboratório em Lisboa foram separados dos mortos, sendo posteriormente conservados a -20°C. A partir de julho de 2012, os mosquitos mortos à chegada ao laboratório foram imediatamente conservados a -20°C, sendo os vivos mantidos em insetário, a temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, humidade relativa de $70 \pm 5\%$ e fotoperíodo luz:escuro de 12:12 horas, durante, pelo menos, 7 dias, com possibilidade de se alimentarem numa solução de sucrose a 10%. Pretendeu-se, assim, aumentar a possibilidade do parasita completar o ciclo de vida no mosquito (Cancrini *et al.* 2003). Todos os dias foram recolhidos os mosquitos mortos e anotada a data da sua morte, sendo que os vivos no final do período de insetário foram mortos pelo frio.

Todos os mosquitos foram conservados a -20°C até ao processamento laboratorial.

Não tendo as colheitas culicideológicas integrado o trabalho prático desenvolvido no âmbito desta dissertação, todas as informações relativas às mesmas foram obtidas por consulta dos registos de campo e insetário correspondentes.

3.1.3. Identificação morfológica dos mosquitos capturados

Os mosquitos capturados foram identificados morfológicamente até à espécie ou complexo de espécies, sobre placas geladas, de acordo com a chave de identificação modificada de Ribeiro & Ramos (1999). Sobre as mesmas placas, e utilizando suporte e material de disseção descartável ou esterilizado pela chama entre exemplares, cada culicídeo fêmea foi separado em abdômen e tórax+cabeça, para permitir, posteriormente, distinguir mosquitos infetados de mosquitos potencialmente infetantes, respetivamente (Favia *et al.* 1996). Dependendo das capturas, foram formados lotes até um máximo de 40 exemplares, sendo que estes pertenciam à mesma espécie, tendo sido capturados pelo mesmo método, no mesmo dia e local, e com morte na mesma data. Sempre que possível, os lotes foram ainda formados por exemplares no mesmo estado gonotrófico, nomeadamente, sem refeição sanguínea (UF), com refeição sanguínea (BF), semi-grávidas (SG) e grávidas (GR). Em colheitas com reduzido número de exemplares foram, na formação dos lotes, associadas num mesmo grupo as fêmeas sem vestígio de refeição sanguínea (UF e GR) e, no outro, as fêmeas com, pelo menos, vestígio desta refeição (BF e SG).

No caso particular das fêmeas do complexo *Culex pipiens*, estas foram mantidas individualmente para posterior identificação de espécie do complexo em caso de positividade para *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856). Em colheitas com um elevado rendimento para esta espécie, definiu-se que, para cada data de morte, seriam processadas individualmente 30 fêmeas de cada estado gonotrófico, sendo as restantes colocadas em lotes.

As amostras continuaram a ser conservadas a -20°C.

3.1.4. Densidade populacional

No que respeita à densidade populacional calculou-se a média e respetivo desvio-padrão, assim como a sua mediana. Estes cálculos foram efetuados separadamente para as armadilhas tipo CDC e para as colheitas de mosquitos em repouso. Para as armadilhas tipo CDC foi calculada a média/mediana do número de mosquitos fêmea, de uma determinada espécie, capturados por armadilha e por noite. Já para as colheitas IR, foi feita uma média/mediana das fêmeas de mosquitos de uma dada espécie que um coletor capturaria por hora. Todos estes resultados, assim como os respetivos gráficos, foram obtidos com recurso ao *software* Microsoft® Office Excel 2007.

A análise estatística para comparação de resultados foi efetuada recorrendo ao *software* IBM SPSS Statistics 20. A normalidade e a homogeneidade das variâncias de cada variável foram averiguadas através dos testes de Kolmogorov-Smirnov (modificação de Lilliefors) e Levene, respetivamente. Como estes pressupostos de aplicabilidade de testes paramétricos não se confirmaram, a significância estatística de algumas diferenças encontradas foi avaliada recorrendo aos testes não paramétricos Mann-Whitney-Wilcoxon e Kruskal-Wallis, admitindo um nível de significância de 0,05. Neste último teste, quando se detetaram diferenças estatisticamente significativas, foram realizadas posteriormente comparações múltiplas Dunn-Bonferroni.

Toda a análise estatística foi feita considerando um grau de confiança de 95%.

3.2. Detecção do ADN do parasita no hospedeiro invertebrado

3.2.1. Extração de ADN

Para este trabalho, definiu-se que seriam processados os tórax+cabeça de todas as fêmeas capturadas, assim como os respetivos abdómenes exceto, no segundo ano, os abdómenes que ainda apresentavam refeição sanguínea (BF e SG). Cada amostra a analisar foi macerada e sujeita a processo de extração de ADN de acordo com uma adaptação do protocolo de extração de ADN pelo método de CTAB (brometo de hexadeciltrimetilamonio), descrito por Stothard *et al.* 1996 (Anexo I). O ADN presente em cada amostra foi posteriormente diluído em tampão TE (Tris-EDTA) a pH 7,0. A sua concentração foi determinada recorrendo ao espectrofotómetro NanoDrop™ 1000 v3.7.1. Sempre que se utilizou um reagente pela primeira vez, foi também realizada extração de ácido desoxirribonucleico (ADN) do parasita (*D. immitis*) adulto (gentilmente cedido pelo Professor Doutor Luís Madeira de Carvalho, Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa), servindo este para controlo da extração.

3.2.2. Amplificação do ADN do parasita

Para identificar os mosquitos potencialmente vetores de dirofilariose canina, portanto com ADN do parasita, não só no seu abdómen, mas, principalmente, no seu tórax+cabeça, utilizou-se a técnica de biologia molecular de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com recurso aos *primers* específicos para a região do segundo espaçador do transcrito interno de ADN ribossomal (ITS2), DIDR-F1 e DIDR-R1 (Rishniw *et al.* 2006), cujas sequências se encontram no Anexo II. Estes *primers* permitem, através da amplificação de fragmentos com tamanhos moleculares diferentes, detetar e diferenciar ADN de 6 espécies de microfilárias: *D. immitis* (542pb), *Dirofilaria repens* Railliet e Henry, 1911 (484pb), *Acanthocheilonema reconditum* (Grassi, 1889) (578pb), *Acanthocheilonema dracunculoides* (Gobbold, 1870) (584pb), *Brugia malayi* (Brug, 1927) (615pb) e *Brugia timori* (Partono, 1977) (625pb).

O protocolo de PCR já se encontrava otimizado, sendo a mistura de reação feita para um volume final de 25µl, contendo uma concentração final de 1X *Green GoTaq® Flexi Buffer* (Promega), 6mM de MgCl₂ (Promega), 0,012mM de cada dNTP

(Promega), 0,4pM de cada *primer*, 0,1U/μl de *GoTaq® DNA Polymerase* (Promega) e cerca de 1,6ng/μl de ADN da amostra a testar, sendo o volume final completado com água ultra pura. Os controlos positivos foram realizados recorrendo a ADN de verme adulto fêmea de *D. immitis* ou sangue de cão infetado por *D. repens* (gentilmente cedido pela Professora Doutora Eva Fok, Faculdade de Veterinária da Universidade Szent Istvan, Hungria), enquanto o controlo negativo consistiu em adicionar um volume de água ultra pura equivalente ao da amostra.

O termociclador foi programado para um período de desnaturação de 2 minutos a 94°C, seguindo-se 32 ciclos, cada um com 30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de *annealing* a 60°C, e 30 segundos de extensão a 72°C. Findos os 32 ciclos foi realizada uma extensão final de 7 minutos a 72°C. Os produtos resultantes desta reação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA), contendo Brometo de Etídio a 20mg/ml, sendo, por isso, revelados com radiação ultravioleta (UV).

3.2.3. Determinação da sensibilidade do PCR

Para calcular a sensibilidade do PCR foram realizados dois testes distintos, sendo em ambos processados separadamente abdómen e tórax+cabeça. Numa primeira fase fez-se extração individual de ADN de mosquitos da colónia de *Culex theileri* Theobald, 1903 mantida no insetário do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, de acordo com o método descrito anteriormente, obtendo-se amostras de ADN de mosquitos garantidamente não infetados.

Para um primeiro teste, que permitiu avaliar a capacidade de detetar um mosquito infetado num lote de 40 exemplares (número máximo de exemplares presentes por lote), seleccionou-se uma amostra com um indivíduo de *Cx. theileri* positivo para *D. immitis*, com uma concentração de ADN semelhante à das amostras de mosquitos não infetados (80ng/μl). De seguida, misturou-se ADN deste mesmo mosquito, com ADN de um mosquito da colónia, em proporções variadas, permitindo mimetizar diferentes números de mosquitos positivos presentes num lote. Seguidamente realizou-se a reação de PCR descrita anteriormente. Isto foi feito desde a representação de 4 mosquitos positivos num lote de 40 exemplares até o resultado do

teste ser negativo, sendo que, para representações abaixo de um mosquito positivo, se utilizaram diluições seriadas num fator de 10, da mesma amostra positiva.

Um segundo teste permitiu determinar a quantidade mínima de ADN de parasita que é preciso existir numa amostra para que se detete um mosquito infetado. Neste teste fez-se a mistura de uma quantidade definida de ADN de parasita adulto (10ng, 5ng, 1ng, 0,1ng, 10pg e 1pg) com 80ng de ADN de um mosquito da colónia de *Cx. theileri*, e realizou-se a reação de PCR descrita anteriormente.

3.2.4. Purificação do ADN do parasita e sequenciação

Para cada espécie de mosquito com resultados positivos foi selecionada uma amostra com PCR positivo, sendo o seu produto de PCR purificado usando o *QIAquick PCR Purification Kit*® (Qiagen), de acordo com o protocolo no Anexo III. A sequenciação do ADN purificado, nos sentidos *forward* e *reverse*, ficou a cargo de empresa especializada. As sequências obtidas foram editadas e alinhadas no programa BioEdit (Hall 1999) e, recorrendo à ferramenta BLAST ® (*Basic Local Alignment Search Tool*), comparadas com as presentes no GenBank, a base de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

3.2.5. Cálculo da taxa mínima de infeção

A taxa mínima de infeção (TMI) foi calculada com base na fórmula (número de lotes de mosquitos positivos) / (número total de mosquitos testados) x 1000 (Esteves *et al.* 2005).

3.3. Identificação molecular das espécies de *Culex pipiens* s.l. potenciais vetores

3.3.1. Identificação da forma genética de *Culex pipiens*

Para determinar a forma genética à qual pertenciam os mosquitos *Cx. pipiens* s.l. com PCR positivo para *Dirofilaria* spp., realizou-se uma segunda reação de amplificação de ADN, recorrendo aos *primers* específicos pipCQ11R e molCQ11R e ao *primer* universal CQ11F2, cujas sequências se encontram no Anexo II, e que amplificam os flancos dos microssatélites do locus CQ11 (Bahnck & Fonseca 2006). Estes *primers* permitem distinguir a forma *pipiens* de *Cx. pipiens* s.s. Linnaeus, 1758 (fragmento com cerca de 200pb) e a forma *molestus* (fragmento com cerca de 250pb) desta mesma espécie.

O protocolo de PCR já se encontrava otimizado, sendo a mistura de reação feita para um volume final de 20µl, contendo uma concentração final de 1X *Green GoTaq® Flexi Buffer* (Promega), 2,5mM de MgCl₂ (Promega), 0,2mM de cada dNTP (Promega), 0,15µM dos *primers* CQ11F2 e molCQ11R, 0,1µM do *primer* pipCQ11R, 0,05U/µl de *GoTaq® DNA Polymerase* (Promega), cerca de 0,25ng/µl de ADN da amostra a testar e água ultra pura para completar o volume final. Os controlos positivos foram realizados recorrendo a ADN de um mosquito identificado como homozigótico para *Cx. pipiens* f. *pipiens* e um mosquito identificado como homozigótico para *Cx. pipiens* f. *molestus* (gentilmente cedidos pelo Professor Doutor João Pinto, Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa), ambos capturados na Comporta, Portugal, enquanto o controlo negativo consistiu em adicionar um volume de água ultra pura equivalente ao da amostra.

O termociclador foi programado para um período de desnaturação de 5 minutos a 94°C, seguindo-se 40 ciclos, cada um com 30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de *annealing* a 54°C e 40 segundos de extensão a 72°C. Findos os 40 ciclos, foi realizada uma extensão final de 5 minutos a 72°C. Os produtos resultantes desta reação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TAE, contendo Brometo de Etídio a 20mg/ml, sendo, por isso, revelados com UV.

Nesta reação, não só *Cx. pipiens* f. *molestus* obtém um fragmento de 250pb, o mesmo acontece com *Culex quinquefasciatus* Say, 1823, uma outra espécie do complexo *Cx. pipiens*.

3.3.2. Distinção entre *Cx. pipiens* f. *molestus* e *Cx. quinquefasciatus*

Para confirmar que amostras identificadas, no PCR anterior, como *Cx. pipiens* f. *molestus* o eram realmente, e não pertenciam antes à espécie *Cx. quinquefasciatus*, um outro PCR foi realizado. Este foi descrito por Smith & Fonseca (2004) e baseia-se na existência de polimorfismos no segundo intrão do locus da acetilcolinesterase-2 (*ace-2*) nos membros do complexo *Cx. pipiens*. Assim, para esta reação foram utilizados os *primers* específicos ACEquin e ACEpip e o *primer* universal B1246s, cujas sequências se encontram no Anexo II. Estes *primers* permitem distinguir as espécies *Cx. pipiens* s.s. (com amplificação de fragmento com 610pb) e *Cx. quinquefasciatus* (com amplificação de fragmento com 274pb) e, ainda, detetar a existência de híbridos entre as duas espécies (com amplificação dos 2 fragmentos anteriores).

O protocolo deste PCR já se encontrava otimizado, e a mistura de reação foi feita para um volume final de 20µl, contendo uma concentração final de 1X *Green GoTaq® Flexi Buffer* (Promega), 3,125mM de MgCl₂ (Promega), 0,16mM de cada dNTP (Promega), 0,1mg/ml de BSA, 0,4µM do *primer* B1246s, 0,4µM do *primer* ACEquin, 0,2µM do *primer* ACEpip, 0,05U/µl de *GoTaq® DNA Polymerase* (Promega) e cerca de 0,25ng/µl de ADN da amostra a testar, sendo o volume final completado com água ultra pura. Os controlos positivos foram realizados recorrendo a ADN de um mosquito identificado como *Cx. pipiens* s.s. e um mosquito identificado como *Cx. quinquefasciatus* (gentilmente cedido pelo Professor Doutor João Pinto, Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa), capturado na Ilha de Santiago, Cabo Verde, enquanto o controlo negativo consistiu em adicionar um volume de água ultra pura equivalente ao da amostra.

O termociclador foi programado para um período de desnaturação de 5 minutos a 94°C, seguindo-se 35 ciclos, cada um com 30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de *annealing* a 55°C, e 40 segundos de extensão a 72°C. Findos os 40 ciclos foi realizada uma extensão final de 5 minutos a 72°C. Os produtos resultantes desta reação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, em tampão TAE, contendo Brometo de Etídio a 20mg/ml, sendo, por isso, revelados com UV.

3.4. Identificação do período de potencial transmissão de *D. immitis*

Os dados de temperatura diária dos três anos civis de colheitas, portanto, 2011, 2012 e 2013, nas estações de Coimbra, Santarém e Setúbal, foram obtidos no Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA).

Com o objetivo de determinar o período teórico em que existiu risco de transmissão de dirofilariose, nos anos em estudo, e recorrendo ao *software* Microsoft® Office Excel 2007, calculou-se não só o valor de DDU para cada dia e em cada estação ($DDU = Temperatura\ média - 14$), como também, o somatório de DDU dos 30 dias seguintes (DDU/30dias). Apenas nos casos em que este somatório é igual ou superior a 130 DDU/30dias se admite a possibilidade de um mosquito infetado nesse dia poder tornar-se infetante nos 30 dias seguintes (Genchi *et al.* 2005; Genchi *et al.* 2009; Sassnau *et al.* 2014). Utilizando o mesmo *software*, foi com base nestes cálculos gerada uma figura que mais facilmente permite a perceção dos períodos favoráveis à transmissão de dirofilariose nas áreas e período estudados.

4. Resultados

4. Resultados

4.1 Colheita de mosquitos

Durante o período de colheitas, foi capturado um total de 9156 fêmeas e 163 machos de mosquitos, representado 4 géneros e 11 espécies, nomeadamente *Aedes* (*Ochlerotatus*) *berlandi* Seguy, 1921, *Aedes* (*Ochlerotatus*) *caspius* (Pallas, 1771), *Aedes* (*Ochlerotatus*) *detritus* s.l., *Anopheles* (*Anopheles*) *claviger* s.l., *Anopheles* (*Anopheles*) *maculipennis* s.l., *Culex* (*Culex*) *pipiens* s.l., *Culex* (*Culex*) *theileri* Theobald, 1903, *Culex* (*Culex*) *univittatus* Theobald, 1901, *Culiseta* (*Culiseta*) *annulata* (Schrank, 1776), *Culiseta* (*Allotheobaldia*) *longiareolata* (Macquart, 1838) e *Culiseta* (*Culiseta*) *subochrea* (Edwards, 1921). A ocorrência de qualquer uma destas espécies ou complexo de espécies já havia sido anteriormente reportada em Portugal continental.

A distinção entre as duas espécies do complexo *Ae. detritus* (*Aedes detritus* (Haliday, 1833) e *Aedes coluzzii* Rioux, Guivard & Pasteur, 1998) era, à data do processamento dos exemplares capturados, apenas possível por análise isoenzimática (Rioux *et al.* 1998), incompatível com a análise molecular para deteção de *Dirofilaria* spp.. No caso do complexo *An. claviger*, a distinção entre as espécies é feita por observação morfológica das formas larvares associadas (Ribeiro & Ramos 1999). Não tendo sido feitas prospeções larvares, só foi possível identificar os exemplares capturados até ao nível do complexo. No que respeita aos complexos *An. maculipennis* e *Cx. pipiens*, a distinção é possível, para ambos os complexos, por técnicas moleculares e por observação morfológica dos ovos, no caso do primeiro complexo, e da genitália masculina, no caso do segundo. Por questões logísticas não se procedeu a essa distinção pelo que os exemplares são também identificados apenas até ao nível do complexo de espécies.

Na Tabela 1 são apresentados, por espécie ou complexo de espécies, os números de indivíduos capturados e respetivas frequências relativas.

Tabela 1. Número de fêmeas capturadas de cada espécie ou complexo de espécies e respetiva frequência relativa.

Espécie	Nº fêmeas capturadas	Frequência relativa
<i>Aedes berlandi</i>	2	0,02%
<i>Aedes caspius</i>	601	6,56%
<i>Aedes detritus</i> s.l.	23	0,25%
<i>Anopheles claviger</i> s.l.	4	0,04%
<i>Anopheles maculipennis</i> s.l.	406	4,43%
<i>Culex</i> sp.*	173	1,89%
<i>Culex pipiens</i> s.l.	1940	21,19%
<i>Culex theileri</i>	5812	63,48%
<i>Culex univittatus</i>	145	1,58%
<i>Culiseta annulata</i>	17	0,19%
<i>Culiseta longiareolata</i>	30	0,33%
<i>Culiseta subochrea</i>	3	0,03%
TOTAL	9156	100,00%

*30 exemplares seriam *Cx. theileri* ou *Cx. univittatus*.

No conjunto das colheitas, *Cx. theileri* foi a espécie mais frequentemente capturada, representando 63,48% das mesmas, seguida de *Cx. pipiens* s.l. (21,19%). As restantes espécies foram capturadas com muito menor frequência, representando sempre menos de 10% das colheitas e verificando-se ainda que cinco das espécies nem sequer atingiram 1% de abundância.

No conjunto das colheitas (Total, Figuras 11 e 12), *Cx. theileri* e *Cx. pipiens* s.l., para além de terem sido capturadas com maior frequência no período em estudo, apresentaram ainda frequências relativas semelhantes em cada um dos anos (cerca de 60 e 20%, respetivamente). *Culex theileri* foi a espécie mais frequente nos distritos de Coimbra e Santarém, logo seguida de *Cx. pipiens* s.l., sendo esta última a espécie mais frequente em Setúbal (Figuras 11 e 12). No entanto, enquanto no distrito de Santarém a frequência relativa destas espécies foi estável ao longo do período em estudo, o mesmo não pode dizer-se dos distritos de Coimbra e Setúbal, onde ocorreram variações de abundância superiores a 10% pelo menos numa destas espécies.

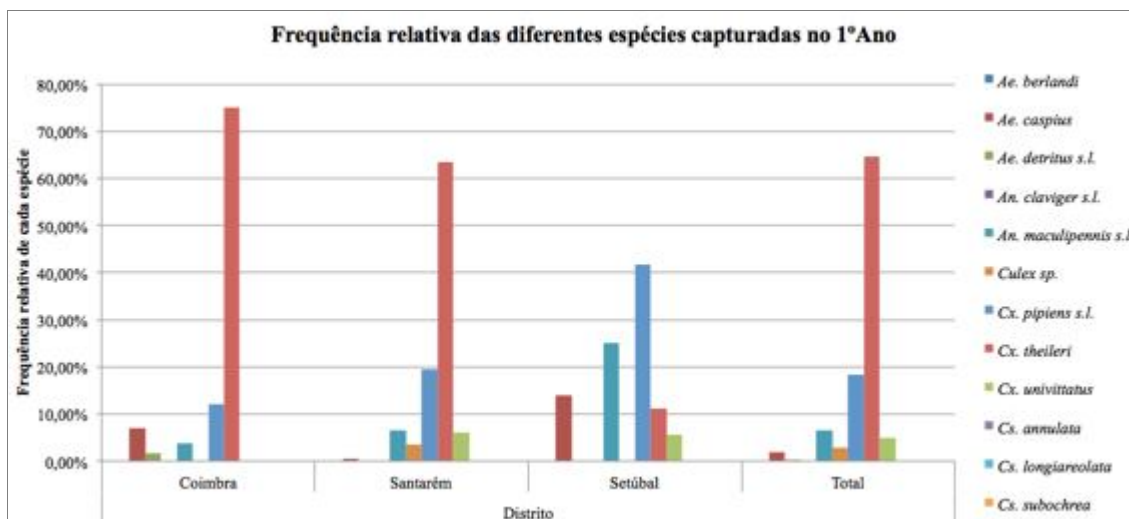


Figura 11. Frequência relativa das diferentes espécies de mosquitos capturadas nos distritos de Coimbra, Santarém e Setúbal, por CDC e IR durante o 1º ano de colheitas.

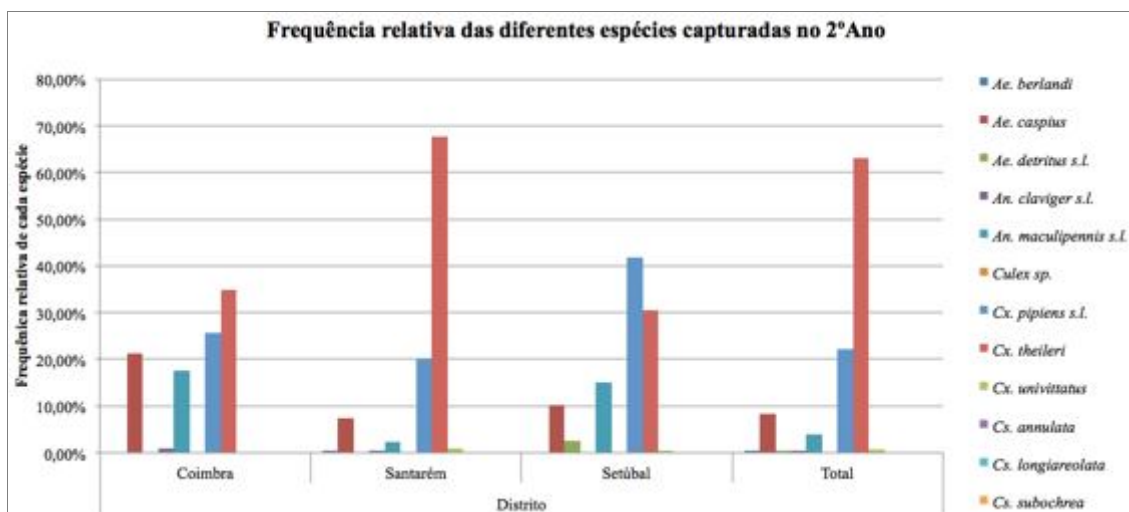


Figura 12. Frequência relativa das diferentes espécies de mosquitos capturadas nos distritos de Coimbra, Santarém e Setúbal, por CDC e IR durante o 2º ano de colheitas.

Na análise estatística efetuada no âmbito deste trabalho, verificou-se pelos testes de Kolmogorov-Smirnov (modificação de Lilliefors) e Levene que as variáveis em estudo não apresentavam uma distribuição normal, nem homogeneidade de variâncias, respetivamente. Assim, toda a análise estatística foi efetuada recorrendo a testes de hipóteses não paramétricos, que comparam medianas.

No que respeita às densidades populacionais totais, estas variaram consoante o método de captura utilizado. Para as armadilhas tipo CDC (Figura 13), as densidades populacionais médias e desvio padrão das mesmas em Coimbra, Santarém e Setúbal foram, respetivamente, $25,17 \pm 66,44$ mosquitos/armadilha-noite (mediana= 3 mosquitos/armadilha-noite), $199,18 \pm 769,51$ mosquitos/armadilha-noite (mediana= 22 mosquitos/armadilha-noite) e $17,40 \pm 22,53$ mosquitos/armadilha-noite (mediana= 12 mosquitos/armadilha-noite). A diferença existente entre a mediana da densidade de mosquitos nestes distritos é estatisticamente significativa (Kruskal-Wallis: 14,231, gl= 2, $p= 0,001$), mais especificamente, entre os distritos de Coimbra e Santarém (Dunn-Bonferroni: -22,040, $p= 0,001$). Quanto à mediana da densidade de mosquitos em Setúbal, esta não difere de forma estatisticamente significativa nem da de Coimbra (Dunn-Bonferroni: -6,954, $p> 0,05$), nem da de Santarém (Dunn-Bonferroni: 15,086, $p> 0,05$).

Ainda para as armadilhas CDC (Figura 13), as densidades populacionais médias no primeiro ano foram de $31,73 \pm 85,05$ mosquitos/armadilha-noite (mediana= 3 mosquitos/armadilha-noite) em Coimbra, $79,2 \pm 207,88$ mosquitos/armadilha-noite (mediana= 11 mosquitos/armadilha-noite) em Santarém e $3 \pm 5,93$ mosquitos/armadilha-noite (mediana= 0 mosquitos/armadilha-noite) em Setúbal. No segundo ano, o valor destas densidades médias foi de $19,17 \pm 46,59$ mosquitos/armadilha-noite (mediana= 3,5 mosquitos/armadilha-noite) em Coimbra, $332,50 \pm 1097,61$ mosquitos/armadilha-noite (mediana= 42 mosquitos/armadilha-noite) em Santarém e $27 \pm 24,56$ mosquitos/armadilha-noite (mediana= 17,50 mosquitos/armadilha-noite) em Setúbal. A diferença existente entre as medianas de densidade nos dois anos em Coimbra não é estatisticamente significativa (Mann-Whitney U: 57,5, $p> 0,05$), ao contrário do que acontece para Santarém (Mann-Whitney U: 260,0, $p= 0,001$) e Setúbal (Mann-Whitney U: 88,0, $p= 0,001$).

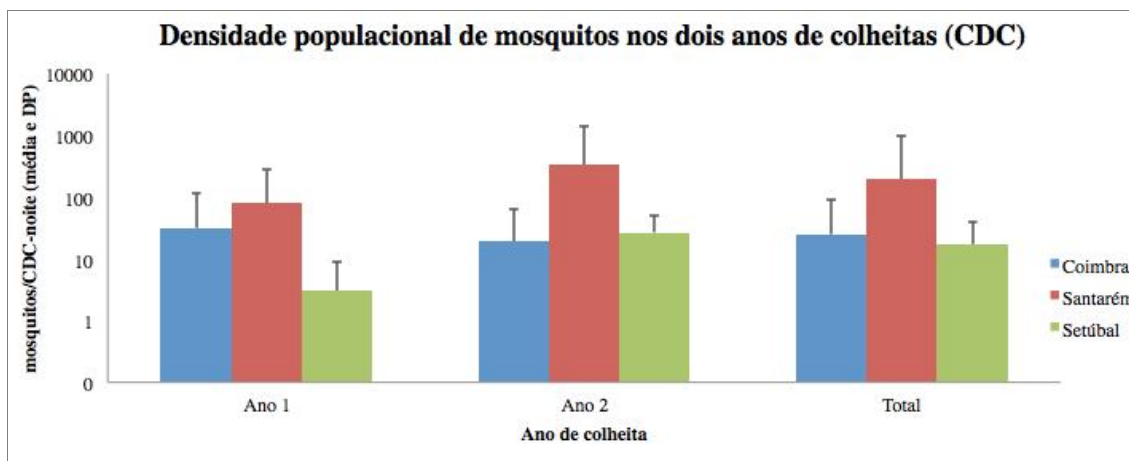


Figura 13. Densidades populacionais médias em Coimbra, Santarém e Setúbal nos dois anos de colheitas, para as armadilhas CDC (eixo vertical em escala logarítmica). DP - desvio-padrão.

Relativamente às diferentes espécies capturadas nas armadilhas CDC, as capturadas com maior densidade populacional média são *Cx. theileri* com $71,07 \pm 429,51$ mosquitos/armadilha-noite (mediana= 0 mosquitos/armadilha-noite), *Cx. pipiens* s.l. com $21,56 \pm 51,36$ mosquitos/armadilha-noite (mediana= 7 mosquitos/armadilha-noite) e *Ae. caspius* com $7,25 \pm 49,13$ mosquitos/armadilha-noite (mediana= 0 mosquitos/armadilha-noite). A mediana de densidade de *Cx. theileri* apresentou uma diferença estatisticamente significativa entre os 3 distritos (Kruskal-Wallis: 8,548, gl= 2, $p= 0,014$), verificando-se esta diferença, no entanto, apenas entre os distritos de Coimbra ($16,30 \pm 59,47$ mosquitos/armadilha-noite, mediana= 0 mosquitos/armadilha-noite) e Santarém ($138,39 \pm 622,81$ mosquitos/armadilha-noite, mediana= 1,5 mosquitos/armadilha-noite) (Dunn-Bonferroni: -16,637, $p= 0,004$). A densidade desta espécie no distrito de Setúbal ($6,15 \pm 12,77$ mosquitos/armadilha-noite, mediana= 1 mosquito/armadilha-noite) não apresentou diferenças relativamente aos distritos de Coimbra (Dunn-Bonferroni: -11,357, $p > 0,05$) e Santarém (Dunn-Bonferroni: 5,281, $p > 0,05$).

A mediana de densidade de *Cx. pipiens* s.l. diferiu entre os 3 distritos de forma estatisticamente significativa (Kruskal-Wallis: 19,277, gl=2, $p < 0,001$), estando esta diferença quer entre o distrito de Santarém ($39,18 \pm 70,88$ mosquitos/armadilha-noite, mediana= 15 mosquitos/armadilha-noite) e o distrito de Coimbra ($4,78 \pm 7,66$

mosquitos/armadilha-noite, mediana= 0 mosquitos/armadilha-noite) (Dunn-Bonferroni: -25,365, $p < 0,001$), quer entre o distrito de Santarém e o distrito de Setúbal (7,35±8,91 mosquitos/armadilha-noite, mediana= 2,5 mosquito/armadilha-noite) (Dunn-Bonferroni: 17,353, $p = 0,006$). A diferença entre o valor das medianas da densidade de *Cx. pipiens* s.l. nos distritos de Coimbra e Setúbal não é estatisticamente significativa (Dunn-Bonferroni: -8,012, $p > 0,05$).

Para *Ae. caspius* também existe uma diferença estatisticamente significativa entre as medianas da sua densidade nos 3 distritos (Kruskal-Wallis: 12,930, $gl = 2$, $p = 0,002$). Esta diferença encontra-se entre os distritos de Santarém (11,87±71,34 mosquitos/armadilha-noite, mediana= 0 mosquito/armadilha-noite) e Setúbal (2,80±4,40 mosquitos/armadilha-noite, mediana= 1 mosquito/armadilha-noite) (Dunn-Bonferroni: -18,375, $p < 0,001$). A densidade desta espécie em Coimbra (3,48±11,48 mosquitos/armadilha-noite, mediana= 0 mosquito/armadilha-noite) não difere de forma estatisticamente significativa da dos outros distritos (Dunn-Bonferroni: -8,065, $p > 0,05$; -10,310, $p > 0,05$, Santarém e Setúbal respetivamente).

No que respeita às colheitas de mosquitos em repouso no interior (IR) (Figura 14), as densidades populacionais médias para Coimbra, Santarém e Setúbal foram, respetivamente, 0,27±1,28 mosquitos/coletor-hora (mediana= 0 mosquitos/coletor-hora), 122,45±196,45 mosquitos/coletor-hora (mediana= 42 mosquitos/coletor-hora) e 90,77±79,45 mosquitos/coletor-hora (mediana= 72 mosquitos/coletor-hora). A diferença existente entre a mediana da abundância de mosquitos capturados por este método nestes distritos é estatisticamente significativa (Kruskal-Wallis: 9,802, $gl = 2$, $p = 0,007$), nomeadamente entre os distritos de Coimbra e Setúbal (Dunn-Bonferroni: -16,505, $p = 0,002$). Quanto à mediana da densidade em Santarém, esta não difere de forma estatisticamente significativa nem da de Coimbra (Dunn-Bonferroni: -12,277, $p > 0,05$), nem da de Setúbal (Dunn-Bonferroni: -4,228, $p > 0,05$).

Ainda no que respeita às colheitas IR (Figura 14), as densidades populacionais médias no primeiro ano foram de 44,91±91,69 mosquitos/coletor-hora (mediana= 14,57 mosquitos/coletor-hora) em Coimbra, 124,77±216,98 mosquitos/coletor-hora (mediana= 84 mosquitos/coletor-hora) em Santarém e 20±24,79 mosquitos/coletor-hora (mediana= 12 mosquitos/coletor-hora) em Setúbal. No segundo ano, estas densidades foram 52±165,24 mosquitos/coletor-hora (mediana= 0 mosquitos/coletor-hora) em

Coimbra, $119 \pm 180,72$ mosquitos/coletor-hora (mediana= 30 mosquitos/coletor-hora) em Santarém e $117,30 \pm 76,66$ mosquitos/coletor-hora (mediana= 110 mosquitos/coletor-hora) em Setúbal. A diferença existente entre as medianas da densidade nos dois anos em Coimbra e Santarém não é estatisticamente significativa (Mann-Whitney U: 29, $p > 0,05$; 46, $p > 0,05$, respetivamente), ao contrário do que acontece em Setúbal (Mann-Whitney U: 88,5, $p = 0,001$).

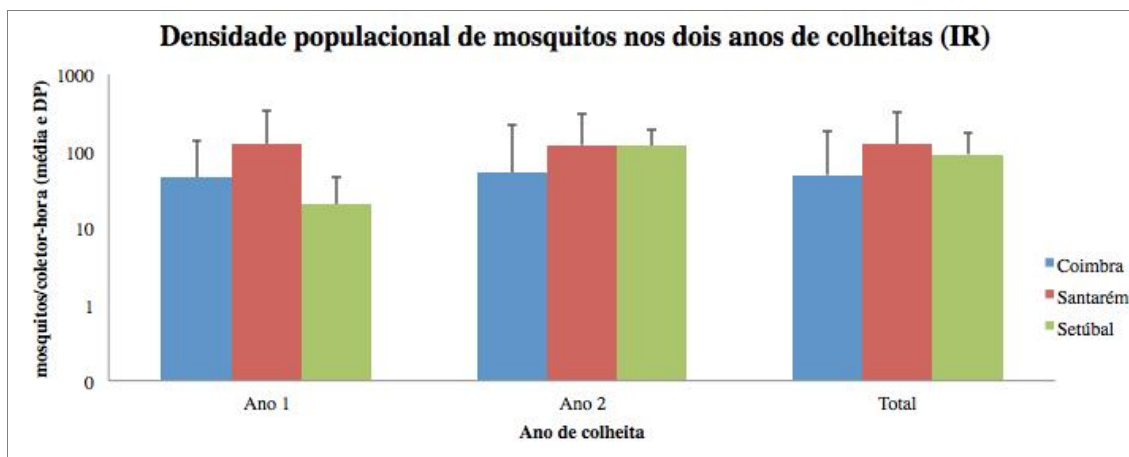


Figura 14. Densidades populacionais médias em Coimbra, Santarém e Setúbal nos dois anos, para colheitas em repouso (eixo vertical em escala logarítmica). DP - desvio-padrão.

Relativamente às diferentes espécies capturadas nas colheitas IR, as espécies com maior densidade populacional média são *An. maculipennis* s.l. com $48,09 \pm 132$ mosquitos/coletor-hora (mediana= 0 mosquitos/coletor-hora), *Cx. pipiens* s.l. com $27,67 \pm 51,28$ mosquitos/coletor-hora (mediana= 0 mosquitos/coletor-hora) e *Cx. theileri* com $7,61 \pm 30,98$ mosquitos/coletor-hora (mediana= 0 mosquitos/coletor-hora). A densidade média de *An. maculipennis* s.l. nas colheitas IR em Coimbra foi $30,78 \pm 117,35$ mosquitos/coletor-hora (mediana= 0 mosquitos/coletor-hora), em Santarém foi $85,31 \pm 187,17$ mosquitos/coletor-hora (mediana= 0 mosquitos/coletor-hora) e em Setúbal foi $31,56 \pm 69,92$ mosquitos/coletor-hora (mediana= 0 mosquitos/coletor-hora). A mediana de densidade desta espécie não apresentou diferença entre os 3 distritos (Kruskal-Wallis: 2,441, gl=2, $p > 0,05$).

A densidade de *Cx. pipiens* s.l., ainda nas colheitas IR, diferiu entre os 3 distritos de forma estatisticamente significativa (Kruskal-Wallis: 7,230, gl=2, $p=0,027$), encontrando-se esta diferença entre os distritos de Coimbra ($4,36 \pm 7,35$ mosquitos/coletor-hora, mediana= 0 mosquitos/coletor-hora) e Setúbal ($51,92 \pm 62,77$ mosquitos/coletor-hora, mediana= 18 mosquitos/coletor-hora) (Dunn-Bonferroni: -13,731, $p=0,008$). No entanto, a densidade desta espécie no distrito de Santarém ($26,61 \pm 54,68$ mosquitos/coletor-hora, mediana= 0 mosquitos/coletor-hora) não difere de forma estatisticamente significativa da de Setúbal (Dunn-Bonferroni: -8,185, $p>0,05$), nem da de Coimbra (Dunn-Bonferroni: -5,545, $p>0,05$).

Finalmente, *Cx. theileri* nas colheitas IR apresentou uma densidade média de $10,91 \pm 48,56$ mosquitos/coletor-hora (mediana= 0 mosquitos/coletor-hora) em Coimbra, $7,16 \pm 21,44$ mosquitos/coletor-hora (mediana= 0 mosquitos/coletor-hora) em Santarém e $4,71 \pm 9,22$ mosquitos/coletor-hora (mediana= 0 mosquitos/coletor-hora) em Setúbal. A mediana da densidade de *Cx. theileri* nas colheitas IR não apresentou diferenças estatisticamente significativa nos três distritos estudados (Kruskal-Wallis: 2,632, gl=2, $p>0,05$).

Analisando individualmente cada distrito, em Coimbra a espécie capturada em maior abundância através das armadilhas CDC no período em estudo (Figura 15) foi *Cx. theileri* ($16,30 \pm 59,47$ mosquitos/armadilha-noite, mediana= 0 mosquitos/armadilha-noite). Esta maior abundância ocorreu tanto no primeiro ano, quando a densidade populacional média foi de $25,27 \pm 82,50$ mosquitos/armadilha-noite (mediana= 0 mosquitos/armadilha-noite), como no segundo, com $8,08 \pm 27,07$ mosquitos/armadilha-noite (mediana= 0 mosquitos/armadilha-noite). Nas colheitas por este método, e em Coimbra, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para qualquer das espécies entre os dois anos.

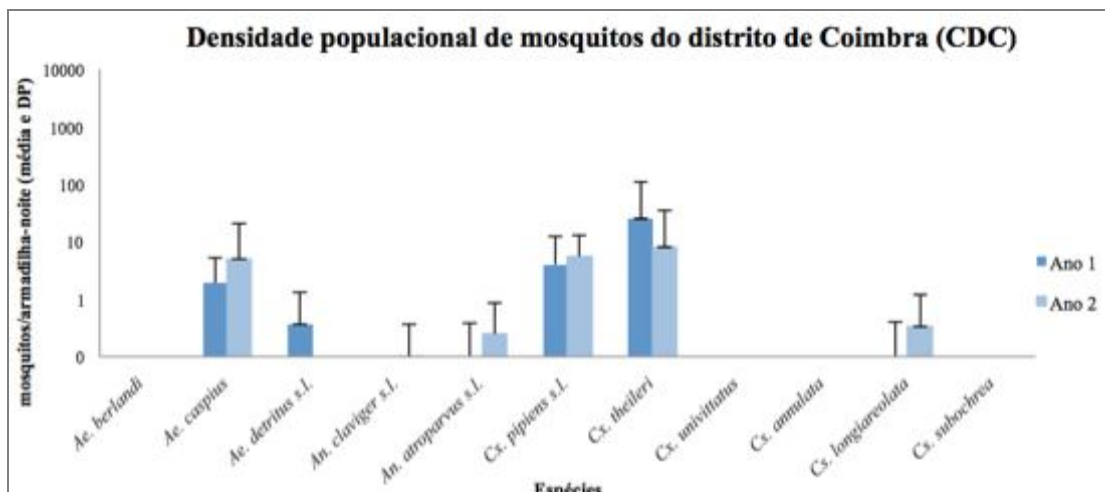


Figura 15. Densidade populacional média de cada espécie, para as armadilhas tipo CDC, no distrito de Coimbra, durante os dois anos de colheitas (eixo vertical em escala logarítmica). DP- desvio-padrão.

Ainda neste distrito, mas nas colheitas IR (Figura 16) destaca-se o contraste existente entre a densidade média de *Cx. theileri* no primeiro ano ($24 \pm 71,78$ mosquitos/coletor-hora, mediana= 0 mosquitos/coletor-hora) e o segundo onde nenhum exemplar foi capturado. Contudo, não existe diferença estatisticamente significativa entre os dois anos (Mann-Whitney U: 59,5; $p > 0,05$), o que também se verifica para qualquer das outras espécies capturadas por este método neste distrito.

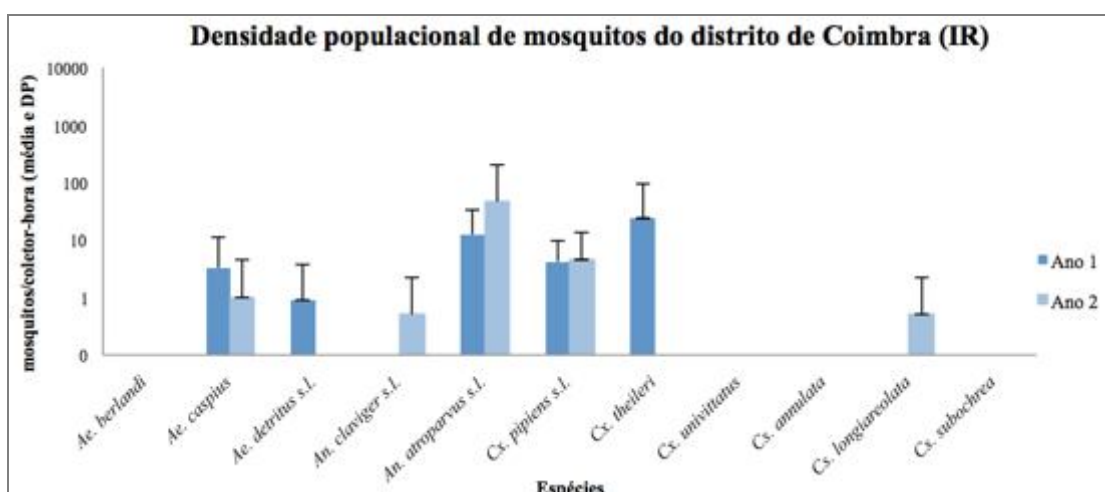


Figura 16. Densidade populacional média de cada espécie, para as colheitas IR, no distrito de Coimbra, durante os dois anos de colheitas (eixo vertical em escala logarítmica). DP- desvio-padrão.

No distrito de Santarém, nas armadilhas tipo CDC (Figura 17), *Cx. theileri* foi, nos dois anos, a espécie com densidade populacional média superior ($55,05 \pm 176,03$ mosquitos/armadilha-noite, mediana= 0 mosquitos/armadilha-noite e $231 \pm 890,15$ mosquitos/armadilha-noite, mediana= 3 mosquitos/armadilha-noite, para os 1º e 2º anos, respetivamente), logo seguida de *Cx. pipiens* s.l. ($15,20 \pm 24,16$ mosquitos/armadilha-noite, mediana= 5,5 mosquitos/armadilha-noite e $65,83 \pm 94,09$ mosquitos/armadilha-noite, mediana= 37 mosquitos/armadilha-noite, para os 1º e 2º anos, respetivamente), sendo a diferença de mediana das densidades, em ambas as espécies nos dois anos, estatisticamente significativa (Mann-Whitney U: 242; $p= 0,011$; 261,5, $p= 0,001$, para *Cx. theileri* e *Cx. pipiens* s.l., respetivamente). Relativamente a *Ae. caspius*, apesar da densidade populacional média ter tido um acréscimo do primeiro ano ($0,45 \pm 1,79$ mosquitos/armadilha-noite, mediana= 0 mosquitos/armadilha-noite) para o segundo ($24,56 \pm 103,68$ mosquitos/armadilha-noite, mediana= 0 mosquitos/armadilha-noite), este acréscimo não corresponde a diferença estatisticamente significativa da abundância da espécie nos dois anos (Mann-Whitney U: 163; $p > 0,05$), o que também se verificou para as restantes espécies capturadas.

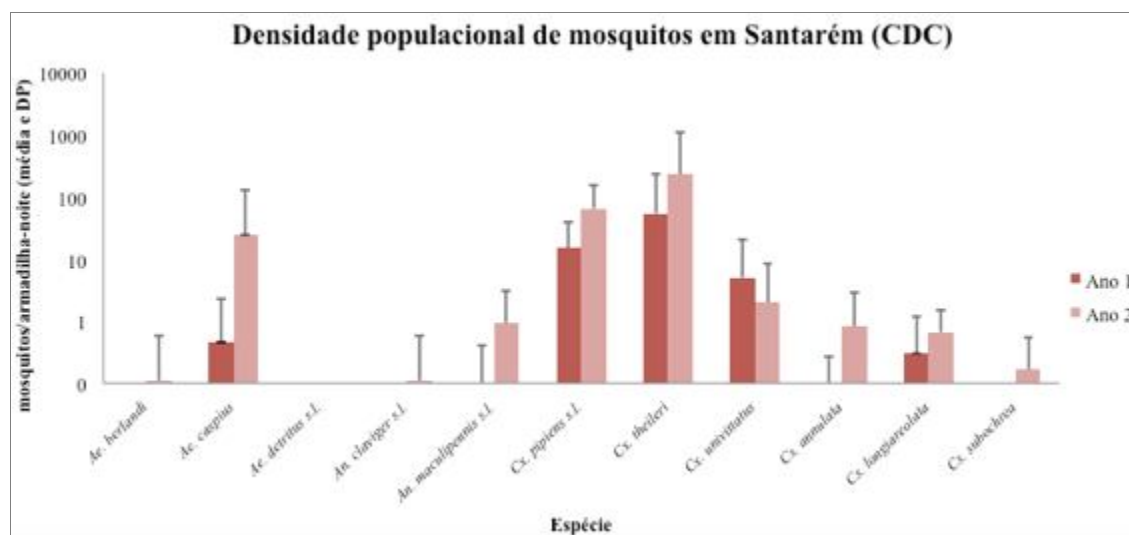


Figura 17. Densidade populacional média de cada espécie, para as armadilhas tipo CDC, no distrito de Santarém, durante os dois anos de colheitas (eixo vertical em escala logarítmica). DP- desvio-padrão.

Relativamente às capturas de mosquitos em repouso (Figura 18), para este mesmo distrito, a maior densidade populacional média encontrada foi a de *An. maculipennis* s.l. nos dois anos ($83,73 \pm 210,12$ mosquitos/coletor-hora, mediana= 0 mosquitos/coletor-hora, e $87,24 \pm 167,35$ mosquitos/coletor-hora, mediana= 6 mosquitos/coletor-hora, para os 1º e 2º anos, respetivamente), seguida da de *Cx. pipiens* s.l. (36 ± 72 mosquitos/coletor-hora, mediana= 0 mosquitos/coletor-hora, e $15,14 \pm 18,77$ mosquitos/coletor-hora, mediana= 6 mosquitos/coletor-hora, para os 1º e 2º anos, respetivamente). Para estes dois complexos, não houve diferença na densidade populacional nos dois anos estudados (Mann-Whitney U: 52,5, $p > 0,05$ para *An. maculipennis* s.l.; Mann-Whitney U: 56, $p > 0,05$ para *Cx. pipiens* s.l.). O mesmo aconteceu para restantes espécies capturadas em IR no distrito de Santarém.

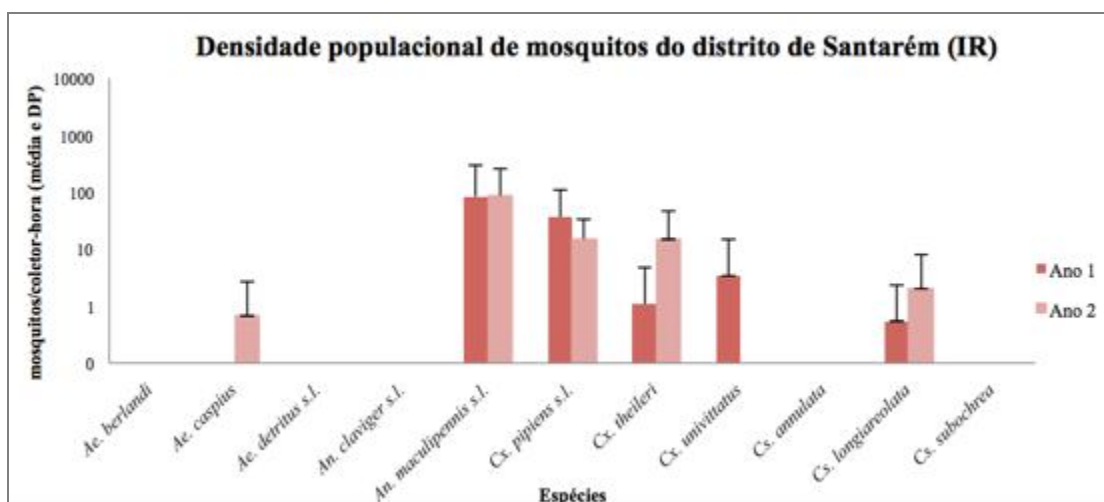


Figura 18. Densidade populacional média de cada espécie, para as colheitas IR, no distrito de Santarém, durante os dois anos de colheitas (eixo vertical em escala logarítmica). DP- desvio-padrão.

Para o distrito de Setúbal, as densidades populacionais totais de mosquitos difere de forma estatisticamente significativa entre os dois anos, quer para as armadilhas tipo CDC ($3 \pm 5,93$ mosquitos/armadilha-noite, mediana= 0 mosquitos/armadilha-noite e $27 \pm 24,56$ mosquitos/armadilha-noite, mediana= 17,5 mosquitos/armadilha-noite, nos 1º e 2º anos, respetivamente) (Mann-Whitney U: 260,5, $p = 0,001$), quer para as capturas de mosquitos em repouso ($20 \pm 24,79$ mosquitos/coletor-hora, mediana= 12

mosquitos/coletor-hora, e $117,3 \pm 76,66$ mosquitos/coletor-hora, mediana= 110 mosquitos/coletor-hora, nos 1º e 2º anos, respetivamente) (Mann-Whitney U: 88,5, $p=0,001$).

No primeiro ano e para as armadilhas tipo CDC (Figura 19), *Cx. pipiens* s.l. foi, claramente, a espécie com maior densidade populacional média ($1,88 \pm 4,55$ mosquitos/armadilha-noite, mediana= 0 mosquitos/armadilha-noite). No segundo ano, além da sua densidade subir ($11 \pm 9,36$ mosquitos/armadilha-noite, mediana= 9 mosquitos/armadilha-noite) (Mann-Whitney U: 86,5, $p=0,002$), a densidade populacional de *Cx. theileri* também subiu de $0,38 \pm 1,06$ mosquitos/armadilha-noite (mediana= 0 mosquitos/armadilha-noite) no primeiro ano, para $10 \pm 15,5$ mosquitos/armadilha-noite (mediana= 2 mosquitos/armadilha-noite) no segundo ano (Mann-Whitney U: 82,5, $p=0,005$). Também para *Ae. caspius* ocorreu numa densidade populacional diferente entre o segundo ano ($42 \pm 5,11$ mosquitos/armadilha-noite, mediana= 2 mosquitos/armadilha-noite), e o primeiro ($0,38 \pm 0,52$ mosquitos/armadilha-noite, mediana= 0 mosquitos/armadilha-noite) (Mann-Whitney U: 78, $p=0,02$). Diferenças estatisticamente significativas não foram encontradas na densidade das outras espécies capturadas por este método em Setúbal.

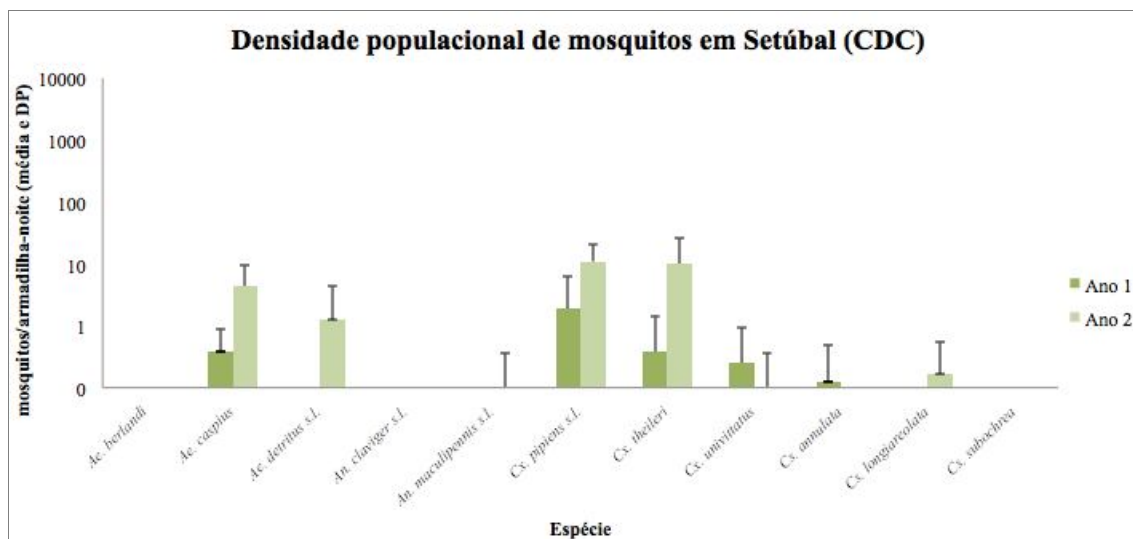


Figura 19. Densidade populacional média de cada espécie, para as armadilhas tipo CDC, no distrito de Setúbal, durante os dois anos de colheitas (eixo vertical em escala logarítmica). DP- desvio-padrão.

Quanto às colheitas de mosquitos em repouso no distrito de Setúbal (Figura 20), no primeiro ano, foram capturadas somente três espécies: *An. maculipennis* s.l. ($14,57 \pm 23,1$ mosquitos/coletor-hora, mediana= 0 mosquitos/coletor-hora), *Cx. theileri* ($1,43 \pm 3,5$ mosquitos/coletor-hora, mediana= 0 mosquitos/coletor-hora) e *Ae. caspius* ($4 \pm 9,8$ mosquitos/coletor-hora, mediana= 0 mosquitos/coletor-hora). Contudo, embora no segundo ano se tenha verificado um aumento da densidade populacional de *An. maculipennis* s.l. ($37,93 \pm 80,67$ mosquitos/coletor-hora, mediana= 0 mosquitos/coletor-hora) e de *Cx. theileri* ($5,95 \pm 10,44$ mosquitos/coletor-hora, mediana= 0 mosquitos/coletor-hora), estas diferenças não são estatisticamente significativas (Mann-Whitney U: 50, $p > 0,05$; 57,5, $p > 0,05$, respetivamente). Registou-se ainda no segundo ano, o aparecimento de *Cx. pipiens* s.l. ($71,39 \pm 63,51$ mosquitos/coletor-hora, mediana= 60 mosquitos/coletor-hora), *Ae. detritus* s.l. ($0,38 \pm 1,5$ mosquitos/coletor-hora, mediana= 0 mosquitos/coletor-hora) e *Cs. logiareolata* ($0,38 \pm 1,5$ mosquitos/coletor-hora, mediana= 0 mosquitos/coletor-hora), sendo, inclusivamente, a primeira destas três espécies (*Cx. pipiens*) a de maior densidade populacional média no segundo ano e única no distrito a apresentar um acréscimo estatisticamente significativo entre anos (Mann-Whitney U: 90, $p = 0,001$).

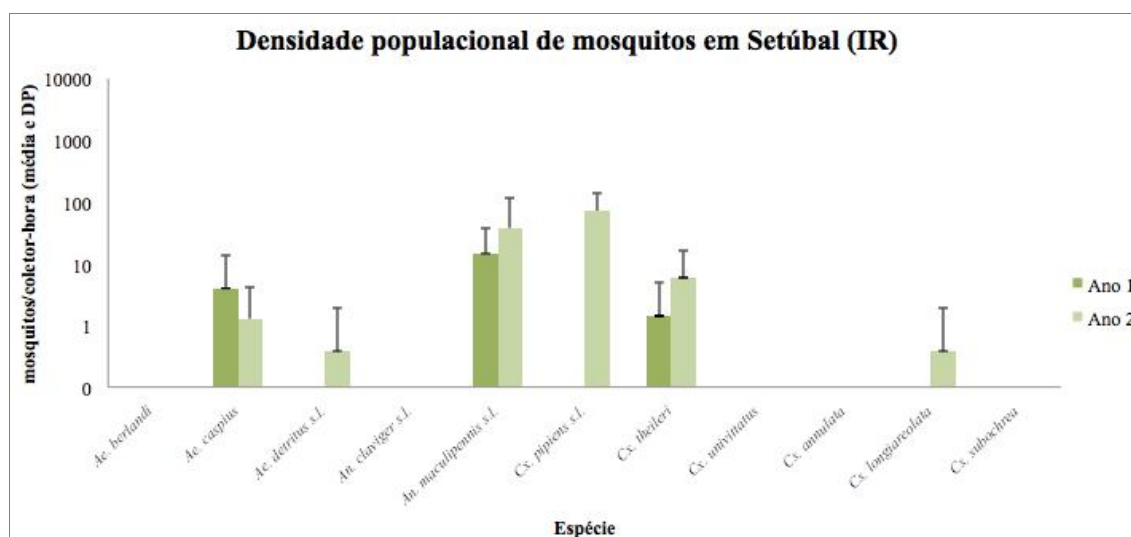


Figura 20. Densidade populacional média de cada espécie, para as colheitas IR, no distrito de Setúbal, durante os dois anos de colheitas (eixo vertical em escala logarítmica). DP- desvio-padrão.

4.2 Detecção de ADN do parasita no hospedeiro invertebrado

Das 9156 fêmeas de mosquito capturadas, 173 só puderam ser identificadas até ao género (Tabela 1) não tendo, por isso, sido processadas. Das restantes 8983 identificadas foram analisadas 5866 amostras de tórax+cabeça e 3748 amostras de abdómen, num total de 1815 e 1529 lotes, respetivamente (Tabela 2). Não sendo logisticamente possível, e em tempo útil, o processamento das 8983 fêmeas identificadas, optou-se pelo não processamento da totalidade das fêmeas capturadas numa única armadilha CDC de elevado rendimento no distrito de Santarém e, ainda, por excluir algumas amostras de abdómen com vestígio de refeição sanguínea (BF e SG) de outras colheitas.

Tabela 2. Número de fêmeas analisadas, por espécie ou complexo de espécies, e respetivos lotes.

Espécie	Nº fêmeas capturadas	Nº amostras analisadas			
		Fêmeas (T)	lotes (T)	Fêmeas (A)	lotes (A)
<i>Ae. berlandi</i>	2	2	2	0	0
<i>Ae. caspius</i>	601	270	193	154	128
<i>Ae. detritus</i> s.l.	23	23	16	22	15
<i>An. claviger</i> s.l.	4	4	4	0	0
<i>An. maculipennis</i> s.l.	406	400	114	222	93
<i>Cx. pipiens</i> s.l.	1940	1595	1123	1543	1072
<i>Cx. theileri</i>	5812	3406	234	1683	126
<i>Cx. univittatus</i>	145	116	94	110	84
<i>Cs. annulata</i>	17	17	10	2	2
<i>Cs. longiareolata</i>	30	30	22	12	9
<i>Cs. subochrea</i>	3	3	3	0	0
TOTAL	8983	5866	1815	3748	1529

T - Tórax+cabeça; A - Abdómen

Através do teste de sensibilidade do PCR na deteção de filárias verificou-se ser possível detetar um exemplar positivo num lote de 40 mosquitos (Anexos IV e V) e, ainda, pelo menos 10pg de ADN de parasita em 80ng de ADN de mosquito (Anexo VI), quer para tórax+cabeça, quer para abdómen.

Pela análise molecular, foram encontrados 31 lotes de abdómen, 13 lotes de tórax+cabeça e 10 lotes de abdómen e correspondentes lotes de tórax+cabeça positivos

para *D. immitis*. Os lotes positivos pertenciam a cinco espécies diferentes: *Ae. caspius*, *Ae. detritus* s.l., *An. maculipennis* s.l., *Cx. pipiens* s.l. e *Cx. theileri* (Figura 21).

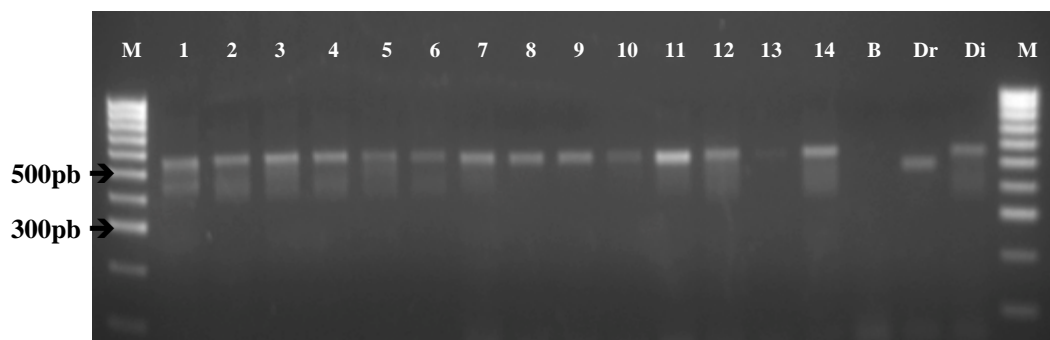


Figura 21. Electroforese em gel de agarose 1,5% do produto de PCR de amostras positivas de *Ae. caspius* (1 – T Coimbra, 2 – T Santarém, 3 – A Setúbal), *Ae. detritus* s.l. (4 e 5 A e T Coimbra), *An. maculipennis* s.l. (6 – T Coimbra, 7 – T Santarém, 8 – A Setúbal), *Cx. pipiens* s.l. (9 – A Coimbra, 10 – A Santarém, 11 – A Setúbal) e *Cx. theileri* (12 – T Coimbra, 13 – T Santarém, 14 – T Setúbal). A- abdómen; T – tórax+cabeça; M – marcador de peso molecular; B - branco; Dr - *D. repens*; Di - *D. immitis*.

A análise das sequências de ADN mostra uma homologia que varia de 89% a 97% entre as sequências obtidas a partir dos fragmentos amplificados nas amostras (disponíveis na base de dados ENA: LN626262 a LN626267] e as sequências de *D. immitis*, para a mesma região, presentes na base de dados do NCBI.

Neste trabalho não foi encontrada nenhuma infeção por *D. repens*, mas foram encontrados dois lotes com amplificação de fragmentos de ADN com tamanhos diferentes dos esperados para os *primers* utilizados, sem nenhuma homologia significativa (<80%) com as sequências presentes no GenBank. Estas amostras pertencem a *Cx. pipiens* s.l. do distrito de Santarém e a *Ae. detritus* s.l. do distrito de Setúbal.

Todas as espécies referidas apresentaram positividade para *D. immitis* no tórax+cabeça pelo menos para um lote, exceto *Cx. pipiens* s.l. em que apenas se detetou ADN do parasita em lotes de abdómen (Tabela 3). Coimbra foi o distrito onde se encontraram percentagens superiores de lotes positivos, para além de ser também o

único onde se encontraram lotes positivos de qualquer uma das cinco espécies referidas. Este foi, ainda, o único distrito onde se detetaram amostras positivas para *D. immitis* em *Ae. detritus* s.l.. Embora em Santarém e Setúbal tenha sido detetado ADN do parasita nas mesmas quatro espécies de mosquito, essa deteção no tórax+cabeça verificou-se apenas para um único lote em Setúbal, pertencente a *Cx. theileri*, ao contrário de Santarém onde foi detetado ADN do parasita em 13 lotes (só tórax+cabeça e tórax+cabeça e abdómen) das espécies *Ae. caspius*, *An. maculipennis* s.l. e *Cx. theileri*.

A significância estatística destes resultados foi efetuada com base na análise dos valores da taxa mínima de infeção (nº de lotes positivos/nº de fêmeas testadas x 1000), que se apresentam na Tabela 4.

Tabela 3. Número de lotes só com T, só com A ou com T+A positivos para *D. immitis*, e respetiva percentagem, nos três distritos.

Distrito	Espécie	Nº fêmeas testadas	Nº lotes positivos		
			T (%)	A (%)	T+A (%)
Coimbra	<i>Ae. caspius</i>	88	2 (2,3%)	5 (5,7%)	1 (1,1%)
	<i>Ae. detritus</i> s.l.	7	0 (0%)	0 (0%)	1 (14,3%)
	<i>An. maculipennis</i> s.l.	63	2 (3,2%)	4 (6,3%)	0 (0%)
	<i>Cx. pipiens</i> s.l.	120	0 (0%)	1 (0,8%)	0 (0%)
	<i>Cx. theileri</i>	396	3 (0,8%)	2 (0,5%)	0 (0%)
	Outras espécies	4	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	Subtotal	678	7 (1%)	12 (1,8%)	2 (0,3%)
Santarém	<i>Ae. caspius</i>	115	0 (0%)	0 (0%)	1 (0,9%)
	<i>Ae. detritus</i> s.l.	0	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	<i>An. maculipennis</i> s.l.	236	2 (0,8%)	1 (0,4%)	1 (0,4%)
	<i>Cx. pipiens</i> s.l.	1200	0 (0%)	6 (0,5%)	0 (0%)
	<i>Cx. theileri</i>	2817	4 (0,1%)	5 (0,2%)	5 (0,2%)
	Outras espécies	162	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	Subtotal	4530	6 (0,1%)	12 (0,3%)	7 (0,2%)
Setúbal	<i>Ae. caspius</i>	67	0 (0%)	1 (1,5%)	0 (0%)
	<i>Ae. detritus</i> s.l.	16	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	<i>An. maculipennis</i> s.l.	101	0 (0%)	2 (2%)	0 (0%)
	<i>Cx. pipiens</i> s.l.	275	0 (0%)	1 (0,4%)	0 (0%)
	<i>Cx. theileri</i>	193	0 (0%)	3 (1,6%)	1 (0,5%)
	Outras espécies	6	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	Subtotal	658	0 (0%)	7 (1,1%)	1 (0,2%)
TOTAL		5866	13 (0,2%)	31 (0,5%)	10 (0,2%)

Os resultados obtidos conduziram ao cálculo de uma taxa mínima de infeção (TMI) global na área em estudo de 9,2/1000 (Tabela 4). Nesta mesma área e período, *Ae. detritus* s.l. foi a espécie que apresentou valor máximo de TMI global (43,4/1000). O distrito de Coimbra apresenta os maiores valores de TMI, quer global quer por espécie, com a única exceção de *Cx. theileri* que apresenta TMI superior no distrito de Setúbal.

Tabela 4. Taxa mínima de infeção por *D. immitis*

Espécie	Coimbra TMI	Santarém TMI	Setúbal TMI	Total TMI
<i>Ae. caspius</i>	90,9	8,7	14,9	37
<i>Ae. detritus</i> s.l.	142,9	0	0	43,4
<i>An. maculipennis</i> s.l.	95,2	16,9	19,8	30
<i>Cx. pipiens</i> s.l.	8,3	5	3,6	5
<i>Cx. theileri</i>	12,6	5	20,7	6,8
TOTAL	31	5,5	12,2	9,2

As taxas mínimas de infeção globais obtidas são estatisticamente diferentes, quer entre distritos (Kruskal-Wallis: 41,116, gl= 2, $p < 0,001$), quer entre espécies (Kruskal-Wallis: 49,732, gl= 10, $p < 0,001$).

Comparando os três distritos estudados, verifica-se que estas diferenças têm origem nos resultados obtidos no distrito de Coimbra: TMI global em Coimbra é diferente da obtida em Santarém (Dunn-Bonferroni: 72,785, $p < 0,001$) e em Setúbal (Dunn-Bonferroni: 53,941, $p = 0,001$), não sendo os resultados em Santarém diferentes dos obtidos em Setúbal.

Ainda na totalidade das colheitas, *Cx. pipiens* s.l. e *Cx. theileri* apresentaram valores de TMI semelhantes e inferiores aos das restantes espécies. Estas diferenças são significativas não só entre *Cx. pipiens* s.l. e *An. maculipennis* s.l. e entre *Cx. pipiens* s.l. e *Ae. caspius* (Dunn-Bonferroni: 71,736, $p < 0,001$; 92,215, $p < 0,001$, respetivamente), como também entre *Cx. theileri* e estes mesmos dois táxones (Dunn-Bonferroni: 66,725, $p < 0,001$; 87,203, $p < 0,001$, respetivamente).

Na análise estatística para cada um dos três distritos, apenas em Coimbra se obtiveram valores de TMI estatisticamente diferentes para as espécies (Kruskal-Wallis: 28,472, gl= 6, $p < 0,001$), com *Cx. pipiens* s.l. a apresentar valores de TMI diferentes

dos de *An. maculipennis* s.l. e de *Ae. caspius* (Dunn-Bonferroni: 28,999, $p= 0,03$; 28,034, $p= 0,014$, respetivamente), o mesmo acontecendo para *Cx. theileri* (Dunn-Bonferroni: 25,542, $p= 0,011$; 26,577, $p= 0,003$, respetivamente). Nos distritos de Santarém e Setúbal os valores da TMI de cada uma das espécies, entre si, não apresentam diferenças significativas (Kruskal-Wallis: 6,186, $gl= 6$, $p> 0,05$; Kruskal-Wallis: 3,606, $gl= 6$, $p> 0,05$, respetivamente).

No que respeita à superioridade dos valores de TMI das diferentes espécies em Coimbra, com exceção de *Cx. theileri* que apresenta valor superior no distrito de Setúbal, verifica-se que essa diferença de TMI, em Coimbra, só é estatisticamente significativa para *Ae. caspius* (Kruskal-Wallis: 10,630, $gl= 2$, $p= 0,005$), comparativamente aos valores obtidos em Santarém (Dunn-Bonferroni: 11,099, $p= 0,006$) e em Setúbal (Dunn-Bonferroni: 10,258, $p=0,004$), e ainda para *An. maculipennis* s.l. (Kruskal-Wallis: 10,680, $gl= 2$, $p= 0,005$) para quem os valores de TMI em Santarém (Dunn-Bonferroni: 15,399, $p= 0,004$) e Setúbal (Dunn-Bonferroni: 14,827, $p= 0,02$) também diferem dos de Coimbra. No que respeita ao valor de TMI de *Cx. theileri* em Setúbal (Kruskal-Wallis: 8,987, $gl= 2$, $p= 0,011$), este só difere de forma estatisticamente significativa em relação ao obtido no distrito de Santarém (Dunn-Bonferroni: -26,832, $p= 0,029$).

4.3 Mosquitos potencialmente vetores por mês e distrito

4.3.1 *Anopheles maculipennis* s.l.

A quase totalidade das fêmeas de *An. maculipennis* s.l. (Figura 22) foi capturada nas colheitas de mosquitos em repouso, sendo por este método que foram capturados todos os mosquitos desta espécie infetados por *D. immitis* (Figuras 23 e 24). No distrito de Coimbra, encontraram-se lotes positivos para este parasita, unicamente, nos meses de maio e julho do ano de 2012. Quanto ao distrito de Santarém, encontraram-se mosquitos infetados por *D. immitis* em todos os meses de colheita do ano de 2012 e em julho de 2011, enquanto em Setúbal, somente em julho de 2012. É importante salientar que foram encontrados mosquitos desta espécie positivos para *D. immitis* em abril (abdómen em Santarém) e outubro (tórax+cabeça em Santarém) de 2012.



Figura 22. Fêmea de *An. maculipennis* s.l. recém alimentada, capturada em 2012 no distrito de Santarém (Fotografia cedida pelo Prof. Paulo Almeida).

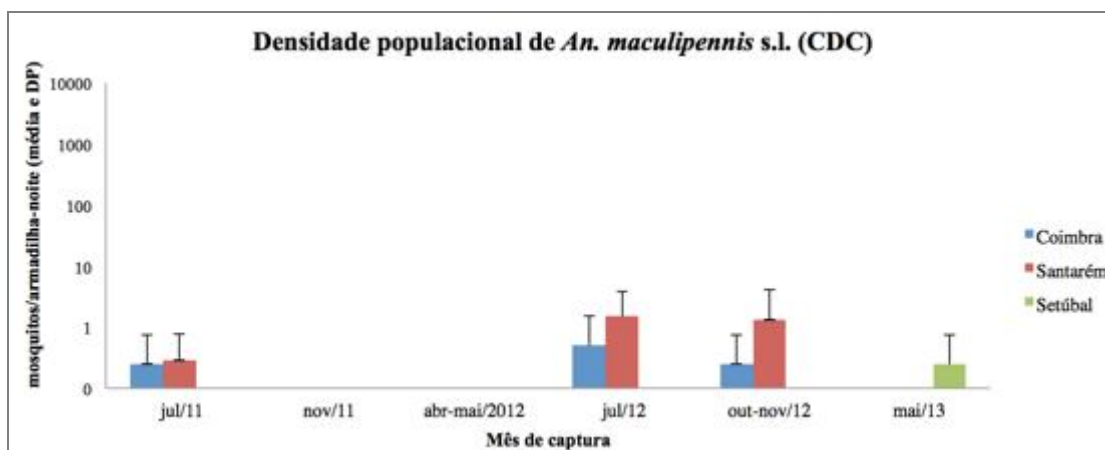


Figura 23. Densidade populacional média de *An. maculipennis* s.l., nas armadilhas tipo CDC, nos vários meses de colheita, por distrito (eixo vertical em escala logarítmica). DP- desvio-padrão.

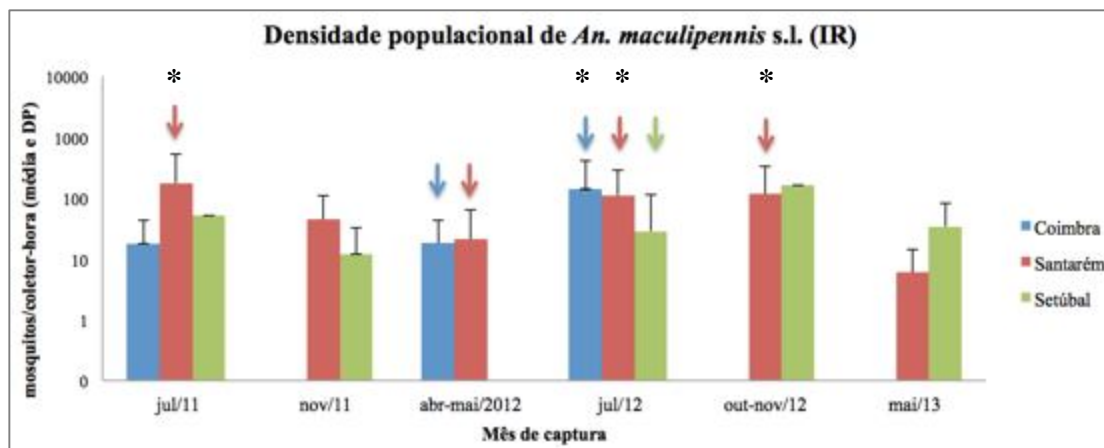


Figura 24. Densidade populacional média de *An. maculipennis* s.l., nas colheitas IR, nos vários meses de colheita, por distrito (eixo vertical em escala logarítmica). Setas indicam a presença de mosquitos infetados por *D. immitis*. DP- desvio-padrão; * - lote de tórax+cabeça positivo.

4.3.2 *Culex pipiens* s.l.

Quanto a *Cx. pipiens* s.l. (Figura 25), como já se referiu, só se detetou *D. immitis* no abdómen de exemplares desta espécie. O único lote positivo para *D. immitis*, no distrito de Coimbra, foi capturado numa armadilha tipo CDC, em julho de 2011. No distrito de Santarém, nas colheitas de mosquitos em repouso em julho de 2011, foi capturado um lote com PCR positivo para este parasita. E, neste mesmo distrito, nas armadilhas tipo CDC, foram encontrados mosquitos com PCR positivo para este parasita nos 2 meses de julho estudados, assim como em maio de 2013. Nesta mesma altura foi capturado o único lote positivo para *D. immitis* em Setúbal (Figuras 26 e 27).

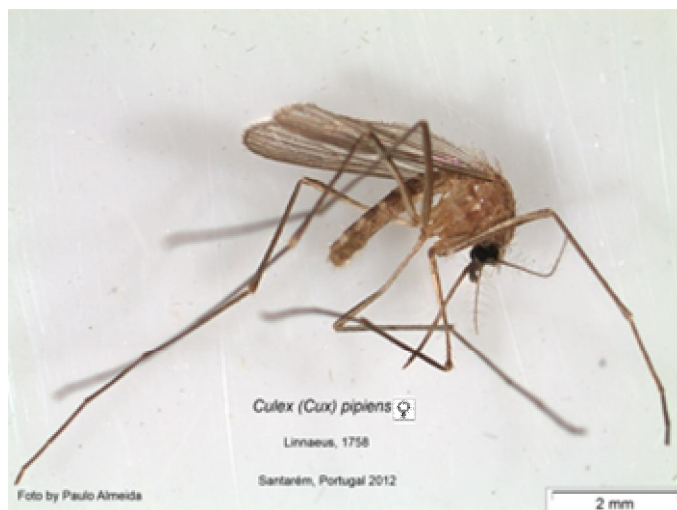


Figura 25. Fêmea de *Cx. pipiens* s.l. sem refeição sanguínea recente, capturada em 2012 no distrito de Santarém (Fotografia cedida pelo Prof. Paulo Almeida).

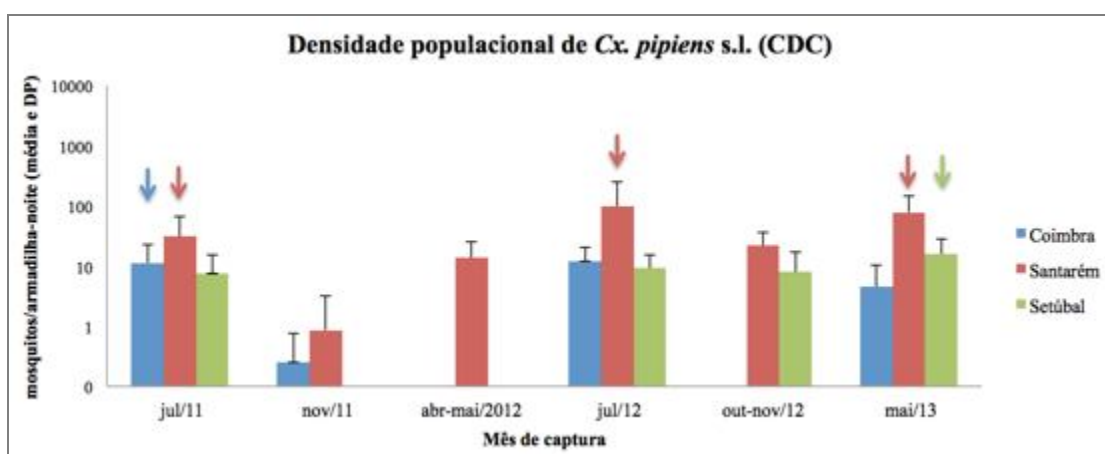


Figura 26. Densidade populacional média de *Cx. pipiens* s.l., nas armadilhas tipo CDC, nos vários meses de colheita, por distrito (eixo vertical em escala logarítmica). Setas indicam a presença de mosquitos infetados por *D. immitis*. DP- desvio-padrão.

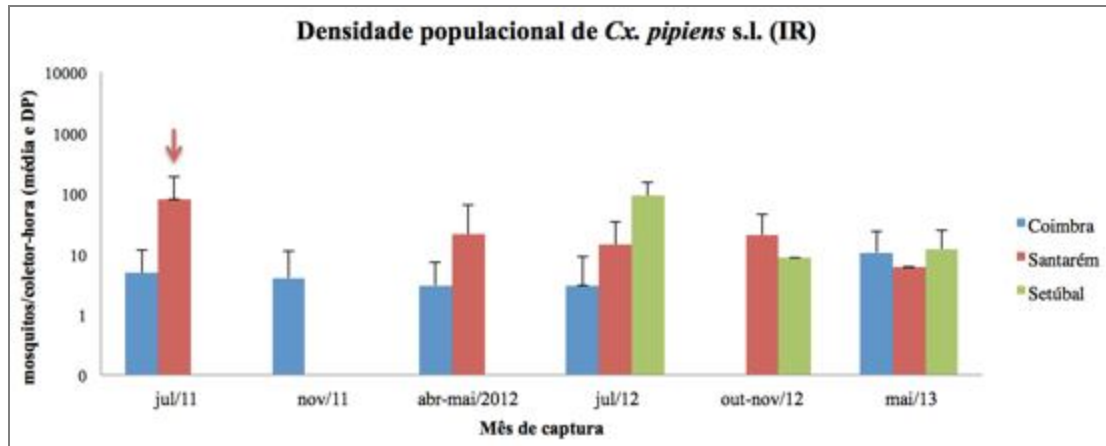


Figura 27. Densidade populacional média de *Cx. pipiens* s.l., nas colheitas IR, nos vários meses de colheita, por distrito (eixo vertical em escala logarítmica). Setas indicam a presença de mosquitos infetados por *D. immitis*. DP- desvio-padrão.

No que respeita à forma genética à qual pertencem os indivíduos com PCR positivo para *D. immitis*, todos foram identificados como *Cx. pipiens* forma *pipiens*, à exceção do exemplar capturado em Setúbal que apresentou uma banda de tamanho correspondente à forma *molestus* (Figura 28), confirmando-se depois que realmente se tratava de um exemplar de *Cx. pipiens* s.s., e não de *Cx. quinquefasciatus* (Figura 29).

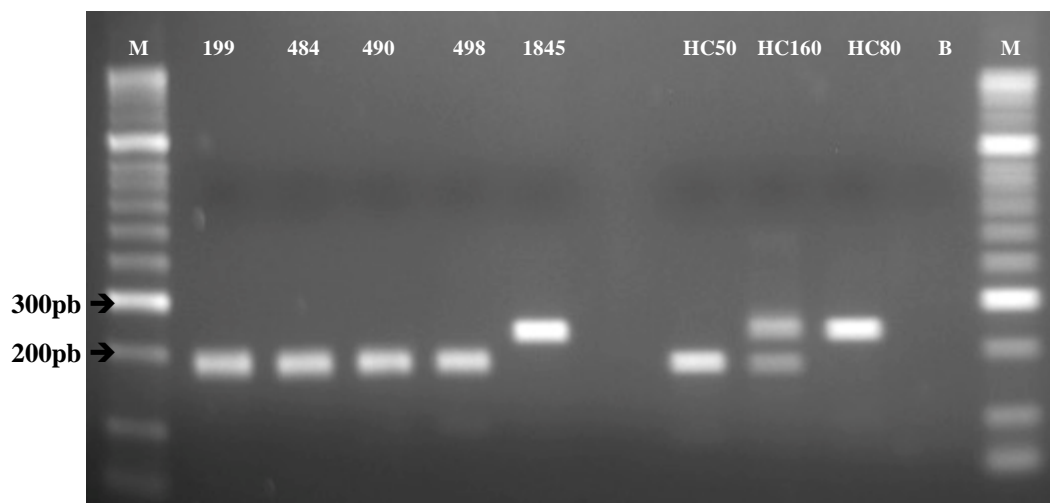


Figura 28. Electroforese em gel de agarose 1,5% do produto de PCR para identificação da forma genética de *Cx. pipiens*. HC50 - Controlo positivo forma *pipiens*; HC160 - Controlo positivo híbrido; HC80 - Controlo positivo forma *molestus*; M - marcador de peso molecular.

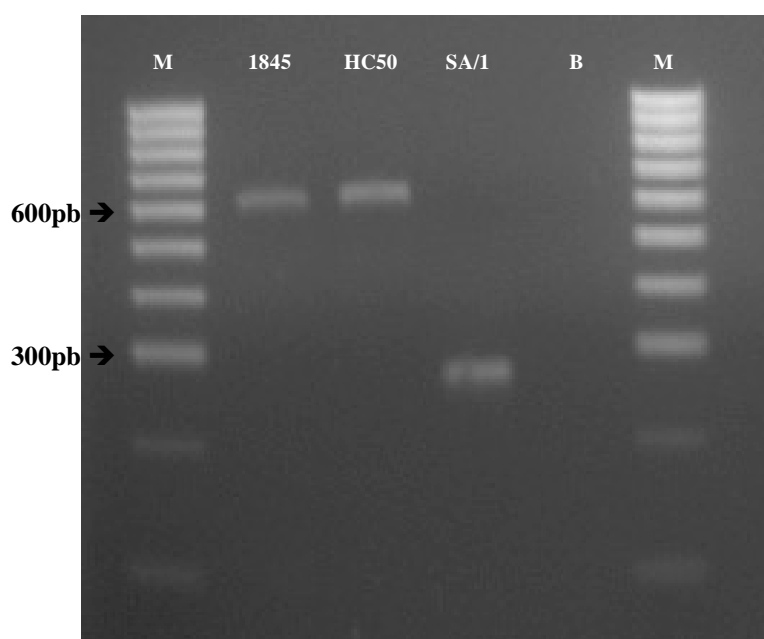


Figura 29. Electroforese em gel de agarose 1,5% do produto de PCR para identificação da espécie do complexo *Cx. pipiens* s.l.. 1845 - amostra a testar; HC50 - Controlo positivo *Cx. pipiens* s.s.; SA/1 - Controlo positivo *Cx. quinquefasciatus*; M - marcador de peso molecular.

4.3.3 *Culex theileri*

Os lotes da espécie *Cx. theileri* (Figura 30) positivos para *D. immitis* foram todos capturados em armadilhas tipo CDC (Figuras 31 e 32), sendo que no distrito de Coimbra foram encontrados somente no mês de julho. Em Santarém foram encontrados não só nos 2 meses de julho estudados, mas também em outubro de 2012. No distrito de Setúbal foram encontrados lotes positivos em julho de 2012 e maio de 2013. É importante referir que foram encontrados lotes positivos para *D. immitis* em maio de 2013 (tórax+cabeça em Setúbal) e outubro de 2012 (tórax+cabeça em Santarém).



Figura 30. Fêmea de *Cx. theileri* grávida, retirada em 2012 da colónia mantida em insetário no Instituto de Higiene e Medicina Tropical (Fotografia cedida pelo Prof. Paulo Almeida).

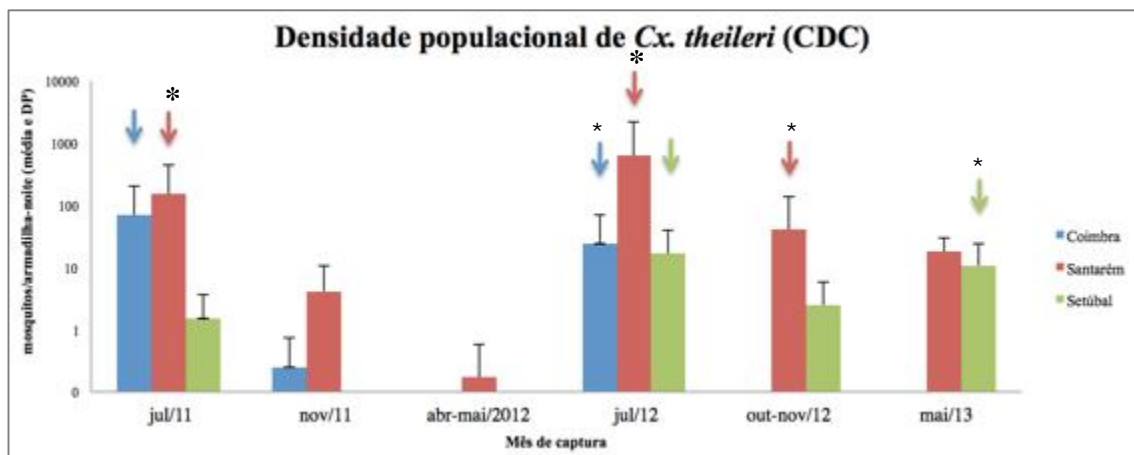


Figura 31. Densidade populacional média de *Cx. theileri*, nas armadilhas tipo CDC, nos vários meses de colheita, por distrito (eixo vertical em escala logarítmica). Setas indicam a presença de mosquitos infetados por *D. immitis*. DP- desvio-padrão; * - lote de tórax+cabeça positivo.

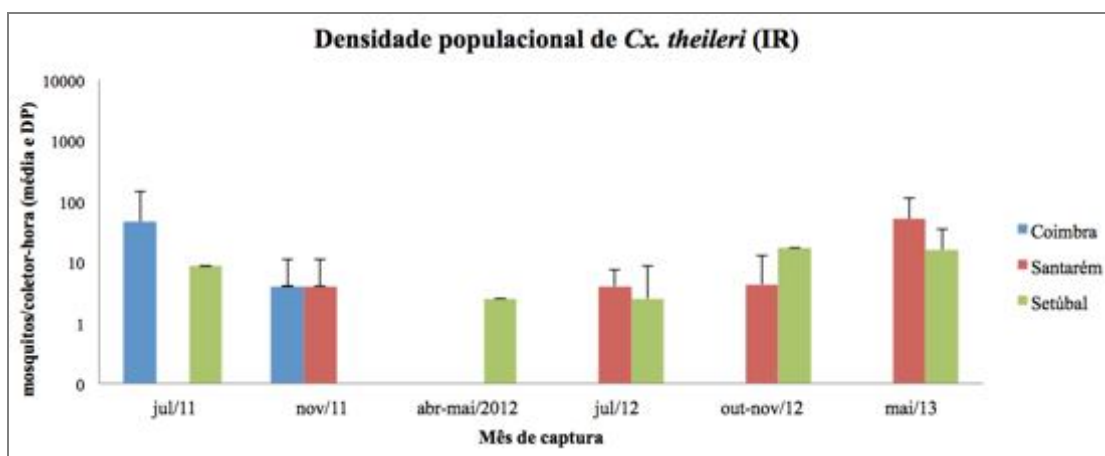


Figura 32. Densidade populacional média de *Cx. theileri*, nas colheitas IR, nos vários meses de colheita, por distrito (eixo vertical em escala logarítmica). DP- desvio-padrão; * - lote de tórax+cabeça positivo.

4.3.4 *Aedes caspius*

Os exemplares de *Ae. caspius* (Figura 33) infetados por *D. immitis* foram todos capturados através de armadilhas tipo CDC, à exceção de um lote que foi encontrado nas capturas de mosquitos em repouso, em Coimbra, em maio de 2012 (Figuras 34 e 35). Neste mesmo distrito foram encontrados indivíduos positivos em julho de 2011 e em maio e julho de 2012. Em Santarém apenas em julho de 2011 foram encontrados mosquitos desta espécie positivos. Já em Setúbal só em maio de 2013 foi encontrado um lote de *Ae. caspius* com PCR positivo para *D. immitis*. É importante referir que, desta espécie, em maio de 2013, em Setúbal, foi capturado um lote com abdómen infetado por *D. immitis*, e em de maio de 2013 foi capturado um lote com tórax+cabeça positivo em Coimbra.



Figura 33. Fêmea de *Ae. caspius* sem refeição sanguínea, capturada em 2012 no distrito de Santarém (Fotografia cedida pelo Prof. Paulo Almeida).

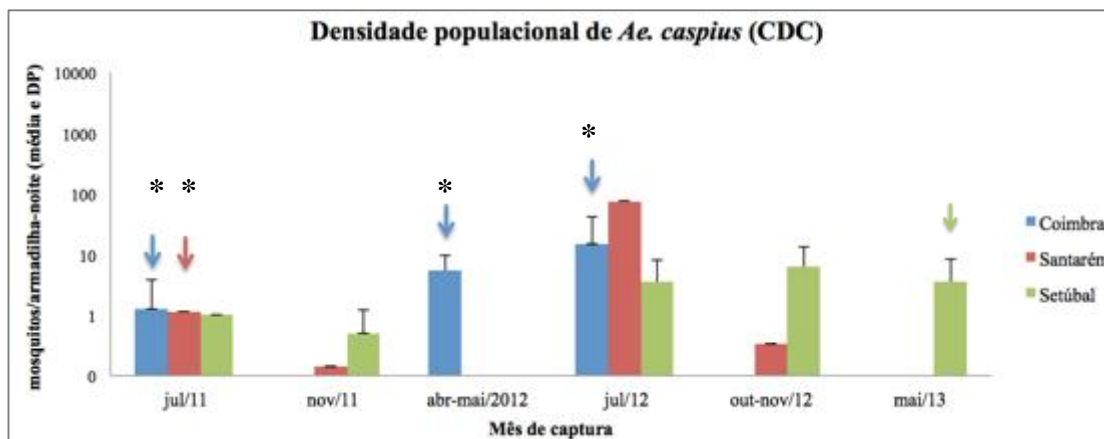


Figura 34. Densidade populacional média de *Ae. caspius*, nas armadilhas tipo CDC, nos vários meses de colheita, por distrito (eixo vertical em escala logarítmica). Setas indicam a presença de mosquitos infetados por *D. immitis*. DP- desvio-padrão; * - lote de tórax+cabeça positivo.

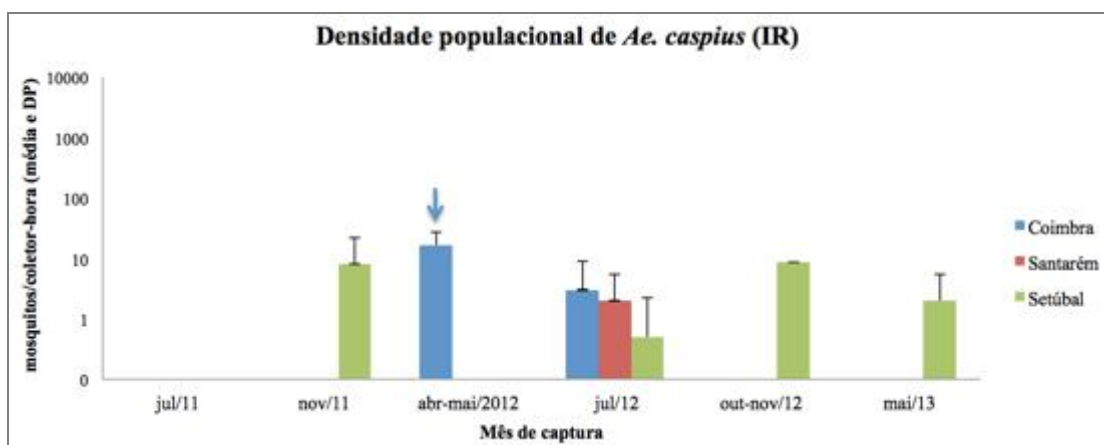


Figura 35. Densidade populacional média de *Ae. caspius*, nas colheitas IR, nos vários meses de colheita, por distrito (eixo vertical em escala logarítmica). Setas indicam a presença de mosquitos infetados por *D. immitis*. DP- desvio-padrão.

4.3.5 *Aedes detritus* s.l.

O único lote de *Ae. detritus* s.l. (Figura 36) com PCR positivo para *D. immitis* foi capturado em maio de 2012, numa captura de mosquitos em repouso, no distrito de Coimbra (Figuras 37 e 38).



Figura 36. Fêmea de *Ae. detritus* s.l., capturada em 2000 no distrito de Setúbal - Exemplar da entomoteca do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (Fotografia da autora).

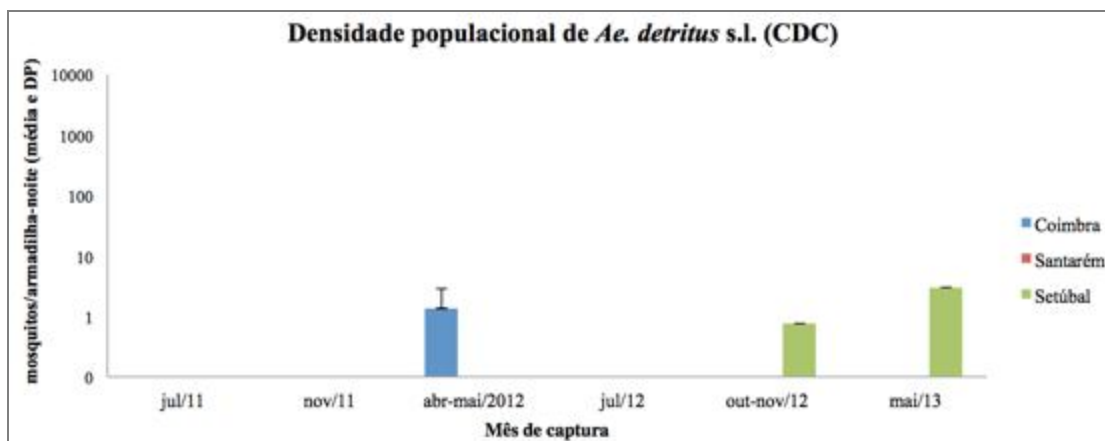


Figura 37. Densidade populacional média de *Ae. detritus* s.l., nas armadilhas tipo CDC, nos vários meses de colheita, por distrito (eixo vertical em escala logarítmica). DP- desvio-padrão.

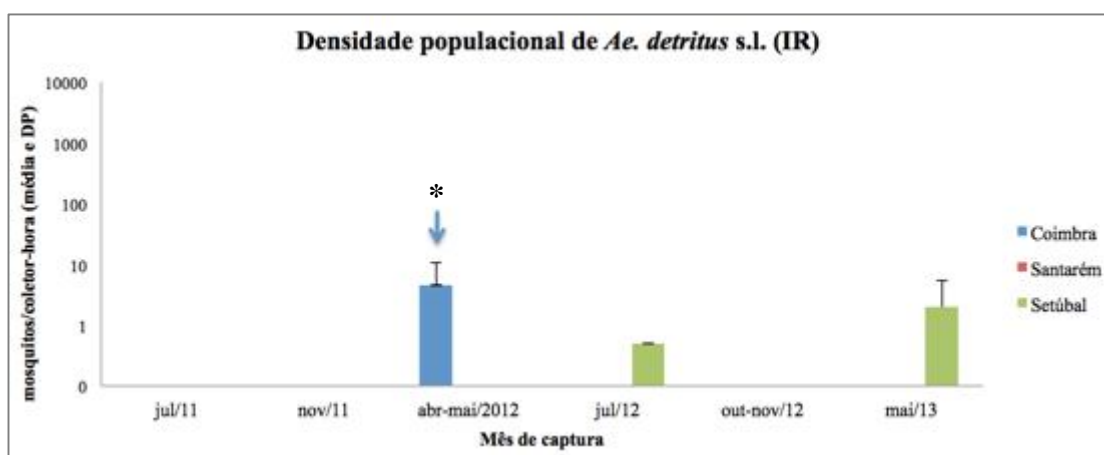


Figura 38. Densidade populacional média de *Ae. detritus* s.l., nas colheitas IR, nos vários meses de colheita, por distrito (eixo vertical em escala logarítmica). Setas indicam a presença de mosquitos infetados por *D. immitis*. DP- desvio-padrão; * - lote de tórax+cabeça positivo.

4.4 Identificação do período de potencial transmissão de *D. immitis*

Após a análise das temperaturas médias das 3 estações climatológicas dos distritos em estudo, e admitindo que para haver desenvolvimento do parasita no mosquito a temperatura deve ser superior a 14°C, que um mosquito tem um período de vida máximo de 30 dias e que são necessárias 130DDU em 30 dias consecutivos para que o parasita atinja o estado L3, determinou-se o número de dias de cada ano propícios ao completo desenvolvimento do parasita no vetor (Tabela 5). Na Figura 39, encontram-se assinalados, além destes dias, os dias de risco de transmissão ao hospedeiro definitivo, os dias de período de pré-patência da infeção e, ainda, os dias onde os mosquitos encontrados positivos para *D. immitis* neste trabalho foram capturados.

Tabela 5. Número de dias propícios ao completo desenvolvimento do parasita no mosquito, durante os anos 2011, 2012 e 2013, por distrito.

Distrito	Ano	Nº dias >14°C	Nº dias ≥130DDU/30dias
Coimbra	2011	207	152
	2012	182	119
	2013	178	117
Santarém	2011	178	165
	2012	172	144
	2013	173	136
Setúbal	2011	230	185
	2012	207	150
	2013	214	136

Verifica-se, a partir dos dados de temperatura obtidos, que o número de dias de possível transmissão pelo vetor, traduzido pela existência de valores de DDU de pelo menos 130 em 30 dias consecutivos, é em qualquer dos distritos superior a 100 dias. Ainda se verificou que o período de potencial transmissão foi superior em 2011 em todos os distritos estudados, decrescendo a partir desse ano.



Figura 39. Identificação do período potencial de transmissão de *D. immitis* em 2011, 2012 e 2013, para os 3 distritos estudados, e marcação dos dias onde foram capturados os mosquitos com PCR positivo para este parasita. Amarelo – dias com temperatura acima dos 14°C; laranja – dias com temperatura acima dos 14°C e com, pelo menos, 130DDU nos 30 dias seguintes; verde – dias de risco de transmissão ao hospedeiro definitivo; roxo – período de pré-patência no hospedeiro definitivo; vermelho – dias em que foram capturados os mosquitos positivos para *D. immitis*.

Comparando os casos de infecção detetados (linhas a vermelho) com os períodos de transmissão previstos por esta metodologia, a quase totalidade deles enquadrou-se nesses mesmos períodos. Detetaram-se, no entanto, um caso de possível infecção recente do vetor (em Coimbra, abril de 2012) e três casos de possível latência do parasita no mosquito (em Santarém, abril de 2012 e em Santarém e Setúbal em abril de 2013).

5. Discussão e Conclusões

5. Discussão e Conclusões

Para a realização deste trabalho, os locais de colheita foram selecionados não por serem representativos das populações culicílicas de cada distrito, mas sim por ser mais provável a ocorrência de transmissão de dirofilariose, portanto onde seria mais provável encontrar os vetores envolvidos. Esta seleção estará na origem de as frequências relativas das espécies encontradas por distrito não estarem de acordo com as encontradas noutros trabalhos de âmbito diferente (Almeida *et al.* 2008; Osório *et al.* 2010).

Globalmente foram detetados 54 lotes positivos para *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856), o que resultou numa TMI de 9,2/1000 mosquitos, sendo esta uma taxa superior às encontradas em outros trabalhos semelhantes, realizados em locais com elevada endemicidade para a doença, como Itália, Turquia ou Coreia (Cancrini *et al.* 2006; Cancrini *et al.* 2007; Lee *et al.* 2007; Yildirim *et al.* 2011).

Uma das espécies encontradas positivas para *D. immitis* neste trabalho pertence ao complexo *Anopheles maculipennis* s.l.. No que respeita a este complexo, até ao momento, a única espécie registada abaixo do sistema montanhoso Montejunto-Estrela é *Anopheles atroparvus* Van Thiel, 1927 (Ramos *et al.* 1978; Pires *et al.* 1982). Neste mesmo sistema montanhoso e nas regiões a norte, além de *An. atroparvus* há registo de *Anopheles maculipennis* s.s. Meigen, 1818 e, ainda, *Anopheles melanoon* Hackett, 1934 (Sousa 2008 *fidae* Capinha *et al.*, 2009), sendo que, para o centro de Portugal é reportado um rácio de abundância *An. atroparvus*:*An. maculipennis* s.s. de 9:1 (Ribeiro *et al.* 1992). Tendo em conta que a distribuição desta espécie, nas últimas décadas, manteve-se inalterada, não tendo sido afetada pelo aumento de temperatura que se verificou nos últimos anos (Capinha *et al.* 2009), é de admitir que todos os exemplares capturados e identificados, neste trabalho, como *An. maculipennis* s.l. pertençam à espécie *An. atroparvus*.

Anopheles atroparvus foi a espécie capturada em maior quantidade nas colheitas de mosquitos em repouso, o que já seria de esperar, pelos seus hábitos marcadamente endofágicos e endofílicos, preferindo abrigos animais (Cambournac & Hill 1938). Além disso, esta espécie prefere realizar as suas refeições sanguíneas ao amanhecer, portanto, não se encontrando muito ativa durante o período em que as armadilhas CDC estiveram colocadas. Os seus hospedeiros preferenciais são cavalos, coelhos e porcos

(Cambournac & Hill 1938), embora na falta destes se possa alimentar em outros mamíferos como cães e humanos.

O complexo *An. maculipennis* s.l. foi registado como vetor de dirofilariose em Itália, com uma TMI de 55,6/1000 mosquitos (Cancrini *et al.* 2006), superior à encontrada neste trabalho (30/1000 mosquitos). Porém, a amostra do referido trabalho foi bastante menor (n=19). Foram detetados mosquitos desta espécie positivos em todos os períodos de colheita de 2012, incluindo um lote de tórax+cabeça positivo em outubro do mesmo ano, coincidente com um pico de densidade da população em Santarém e Coimbra. Este facto leva a concluir que esta espécie poderá de estar envolvida, na área em estudo, ao longo de quase todo o período de transmissão de dirofilariose. No distrito de Setúbal não se encontrou nenhum tórax+cabeça desta espécie positivo. Uma das razões que poderá ter originado este resultado é o facto de o local de colheita onde mais indivíduos desta espécie foram capturados, neste distrito, ser um local com cavaliarias, tendo os mosquitos oportunidade de se alimentar no interior, em cavalos, o que, considerando a sua endofagia, reduz a probabilidade de se alimentarem no exterior em cães.

Dos lotes de *An. atroparvus* positivos quatro deles, apesar de serem fêmeas grávidas ou UF com 6 a 10 dias de insetário, tempo suficiente para o desenvolvimento completo do parasita, não apresentaram tórax+cabeça positivos, podendo indicar que esta espécie não é vetor de dirofilariose. Porém, dado que outros indivíduos apresentaram tórax+cabeça positivos e tendo em conta que tórax+cabeça positivo é indicativo de que o mosquito é capaz de suportar o desenvolvimento do parasita até L3 (Cancrini *et al.* 2007), esta espécie deve ser considerada como um potencial vetor de dirofilariose. Assim, *An. atroparvus* poderá ser responsável pela transmissão da doença nos períodos do amanhecer, em locais abrigados.

Outro grupo encontrado com PCR positivo para *D. immitis* foi o complexo de espécies gémeas *Culex pipiens*. Em Portugal, este complexo é representado por *Culex pipiens* s.s. Linnaeus, 1758 e *Culex torrentium* Martini, 1925, sendo a primeira a única espécie conhecida nos locais de colheitas deste trabalho (Gomes *et al.* 2012), estando por isso os resultados obtidos dentro do esperado. Considera-se atualmente que *Cx. pipiens* tem duas formas genéticas com comportamentos distintos: a forma *pipiens* e a forma *molestus*. A forma *pipiens* caracteriza-se por serem indivíduos anautogénicos,

com diapausa, eurigamos e preferencialmente ornitofílicos. Por seu lado, a forma *molestus* é autogénica, homodinâmica, estenogama e apresenta preferência por se alimentar em mamíferos (Bahnck & Fonseca 2006). Além disso, esta última tem comportamentos marcadamente endofágicos e endofílicos, enquanto a forma *pipiens* tem comportamentos mais plásticos, preferencialmente exteriores (Gomes *et al.* 2013). Como a maioria dos membros desta espécie foram capturados nas armadilhas CDC no exterior, esperar-se-ia que todos os mosquitos desta espécie encontrados positivos para *D. immitis* pertencessem à forma *pipiens*. Contudo, tal não se verificou, havendo um exemplar capturado em Setúbal pertencente à forma *molestus*. Isto poderá estar relacionado com o facto de a armadilha relativa a esta colheita ter sido colocada num espaço que não era completamente aberto.

Geralmente, no que respeita a vetores de dirofilariose, quando *Cx. pipiens* é uma das espécies presentes no local de estudo, esta é à partida considerada um vetor primário, ou espera-se que esteja envolvida na transmissão (Aranda *et al.* 1998; Bargues *et al.* 2006; Cancrini *et al.* 2007; Morchón *et al.* 2007; Yildirim *et al.* 2011; Simón *et al.* 2012;). Todavia, apesar da TMI obtida para esta espécie (5/1000 mosquitos) se aproximar de valores obtidos em outros locais, nomeadamente Itália (5,4/1000 mosquitos) (Cancrini *et al.* 2007), neste trabalho, nenhum tórax+cabeça desta espécie foi encontrado positivo para *D. immitis*. Da deteção de abdómenes positivos, nenhuma informação relevante pode ser extraída, exceto a garantia de que esta espécie está a alimentar-se em animais microfilarémicos, porque a maioria das fêmeas capturadas morreu antes do parasita ter tempo de completar o seu ciclo de vida no insetário. Porém, uma das fêmeas com abdómen positivo era uma fêmea UF, que permaneceu viva seis dias no insetário, portanto com condições para o parasita atingir a forma L3 e migrar para tórax+cabeça. Esta situação, associada ao facto de nenhum exemplar apresentar tórax+cabeça positivo, levanta a questão da capacidade de esta população de *Cx. pipiens* sustentar o desenvolvimento do parasita até L3. Na realidade, estudos apontam para que os mecanismos de defesa dos mosquitos contra as dirofilárias só são eficientes contra microfilarías recém-ingeridas, ou que estão nas células dos tubos de Malpighi, sendo os hemócitos completamente incapazes de bloquear L3 migrantes, e sendo nos hospedeiros invertebrados incompetentes as microfilarías bloqueadas e expelidas (Vegni Talluri & Cancrini 1994). Partindo deste princípio,

admite-se que se foram encontrados abdômenes positivos, as larvas encontravam-se em desenvolvimento, não sendo possível excluir completamente a possibilidade de *Cx. pipiens* atuar como vetor da doença em Portugal. Admitindo que *Cx. pipiens* é vetor da doença em Portugal, esta espécie poderá ter um grande papel na transmissão de dirofilariose, especialmente no verão (mês de julho), altura em que foi encontrada a maioria dos exemplares positivos, dado tratar-se de uma das espécies mais abundantes no território. Sendo os seus hábitos de picada noturnos (Cancrini & Gabrielli 2007), período em que os cães se encontram a dormir, é possível não só a infeção de um maior número de fêmeas, como a oportunidade destas ingerirem um maior número de microfilárias, o que pode aumentar substancialmente o número de L3 (Lowrie 1991). Apesar de haver uma forte correlação negativa entre o número de larvas nos tubos de Malpighi e a sobrevivência do mosquito (Christensen 1978), *Cx. pipiens* é uma espécie com armadura bucal (Coluzzi *et al.* 1981), pelo que parte das microfilárias são destruídas aquando da ingestão.

Assim, a continuação de estudos que permitam avaliar o papel de *Cx. pipiens* na transmissão de dirofilariose canina e, ainda, qual das formas genéticas, ou se as duas formas genéticas, serão responsáveis por essa transmissão apresenta-se como muito relevante. Embora os resultados encontrados neste trabalho possam eventualmente indicar uma possível importância de ambas as formas, um estudo efetuado com a população de *Cx. pipiens* forma molestus na ilha da Madeira determinou que esta não é capaz de sustentar o desenvolvimento completo de *D. immitis* (Gouveia 2007). Além disso, o facto desta última forma ser autogénica torna-a, eventualmente, menos importante na transmissão vetorial de doenças.

Culex theileri Theobald, 1901 é outra das espécies encontradas positivas para *D. immitis*. Esta espécie já havia sido reportada como potencial vetor de dirofilariose em Portugal (Ribeiro *et al.* 1983; Santa-Ana *et al.* 2006), sendo por isso este resultado expectável. A sua TMI é bastante baixa (6,8/1000 mosquitos), quando comparada com as outras espécies, exceto *Cx. pipiens* s.l.. Assim poderia pensar-se que esta não será um bom vetor de dirofilariose. Contudo, tal como já foi dito anteriormente, a importância de uma espécie de mosquitos na epidemiologia das infeções por *Dirofilaria* spp., não depende só da receptividade à infeção e da sua eficiência a transmitir as larvas L3, mas também no tamanho da sua população, do seu hábito de picada, do tempo de vida e da

sua sazonalidade (Cancrini & Gabrielli 2007). *Culex theileri* é a espécie que apresentou maior densidade populacional neste estudo, sendo das espécies mais abundantes no país (Almeida *et al.* 2008; Osório *et al.* 2010;), pelo que, apesar da sua baixa TMI, o seu papel na transmissão de *D. immitis* é muito relevante, tendo sido a única espécie com tórax+cabeça positivos nos 3 distritos do estudo. Pelos resultados destas colheitas, verifica-se que existe um pico de atividade desta espécie nos meses mais quentes, mas também foram encontrados 3 lotes com tórax+cabeça positivos para *D. immitis* no mês de outubro, podendo indicar risco de transmissão de doença para além dos meses de verão. Ao contrário do que acontece com *An. atroparvus* que tem uma preferência por cavalos e outros animais, ou *Cx. pipiens* f. *pipiens* que é ornitofílico, *Cx. theileri* é uma espécie zooantropofílica (Morchón *et al.* 2011), e que poderá, eventualmente, ser um elo de ligação entre *D. immitis* e a população humana. Contudo, não tendo as fêmeas do género *Culex* hábito voar grandes distâncias (Becker *et al.* 2010), a sua capacidade para transmitir dirofilariose deverá ser focal.

Além dos géneros *Anopheles* e *Culex*, também o género *Aedes* foi encontrado como tendo espécies potencialmente vetoras de dirofilariose em Portugal. Um ponto importante é que as duas espécies deste género encontradas positivas para *D. immitis* foram as espécies com maior TMI neste trabalho, nomeadamente, *Aedes caspius* (Pallas, 1771) (37/1000 mosquitos) e *Aedes detritus* s.l. (43,4/1000 mosquitos).

No que respeita a *Ae. caspius*, esta espécie já havia sido descrita como vetora de dirofilariose em Itália (Rossi *et al.* 1999), tendo no entanto sido posteriormente verificado que não se tratava de *Dirofilaria* spp., mas sim de *Setaria labiatopapillosa* (Pietrobelli *et al.* 2002 *fidae* Cancrini *et al.* 2006; Rossi *et al.* 2002 *fidae* Cancrini *et al.* 2006). Um outro estudo, efetuado também em Itália, conclui que esta espécie de mosquito é refratária à infeção, quer por *D. immitis*, quer por *D. repens* (Cancrini *et al.* 2006). Em Portugal *Ae. caspius* já havia sido encontrado tendo larvas L3 de *Dirofilaria* sp. na cabeça, sendo portanto descrito como um potencial vetor de dirofilariose (Ramos *et al.* 1993). Este trabalho vem pela primeira vez confirmar que esta espécie é um potencial vetor de *D. immitis* no nosso país, pois apresenta a comprovação de tórax+cabeça positivos para este parasita, através da análise de sequências de ADN (97% de homologia com sequências presentes no GenBank). Contudo, não pode deixar de referir-se que uma fêmea SG desta espécie esteve oito dias em insetário, e apesar

disso, somente o seu abdómen se encontrava com PCR positivo. Além disso, mesmo que esta fêmea tivesse sido capturada com refeição sanguínea recente, após oito dias em condições otimizadas, já deveria ter atingido o estado de grávida. Sabendo-se que alguns mecanismos de luta contra o parasita conduzem à redução da fecundidade da fêmea (Ferdig *et al.* 1993 *fidae* Christensen *et al.* 2005), pode questionar-se sobre a resposta que esta fêmea estava a ter contra o parasita e até que ponto esta se tornaria uma fêmea potencialmente infetante na natureza. Porém, não deve ser esquecido que o facto de uma espécie ser vetora de uma parasitose, não significa que todas as suas fêmeas sejam suscetíveis ao parasita. Além disso, à semelhança das justificações dadas para *An. atroparvus*, o facto de terem sido encontrados outros exemplares com tórax+cabeça positivos faz com que *Ae. caspius* deva ser encarada como um potencial vetor de dirofilariose canina na região.

Ao contrário das espécies referidas anteriormente que têm apenas um pico diário de atividade, *Ae. caspius* apresenta dois picos: ao amanhecer e pôr-do-sol (Cancrini & Gabrielli 2007), não sendo muito ativa durante a noite, quando os cães repousam e, portanto, são mais suscetíveis às picadas de mosquito. Além disso, apesar de ser atraída por cães, esta espécie é bastante antropofílica (Cancrini & Gabrielli 2007), levando-nos mais uma vez a colocar a hipótese de possível elo entre *D. immitis* e a população humana, dado que a população humana em contacto com estas populações de *Ae. caspius* tem risco de entrar em contacto também com o parasita.

Quanto a *Ae. detritus* s.l., também Cancrini & Gabrielli (2007) já haviam reportado um indivíduo infetado por *D. immitis*, mas apenas com abdómen positivo. Assim, esta é a primeira vez que é encontrado um tórax+cabeça positivo e, portanto, que este complexo pode ser considerado um potencial vetor de dirofilariose canina. O complexo *Ae. detritus* s.l. é composto por duas espécies morfologicamente indistinguíveis: *Aedes detritus* Haliday, 1833 e *Aedes coluzzi* Rioux, Guivard & Pasteur, 1998. Até há pouco tempo, a única forma de distinguir entre as 2 espécies era através de uma técnica de análise iso-enzimática (Pasteur *et al.* 1977) ou das suas características bioecológicas mas, muito recentemente, foi desenvolvida uma técnica de PCR para distinção das mesmas (Bregues *et al.* 2014). Esta distinção é importante, porque cada uma das espécies tem uma bioecologia diferente. Enquanto *Ae. detritus* é uma espécie anautogénica e eurígama, com preferência por criadouros pouco-salinos, *Ae. coluzzi*

pode ser autogénica e é estenogama, conseguindo desenvolver-se em criadouros com elevada salinidade (Rioux *et al.* 1998; Agoulon *et al.* 1999; Veronesi *et al.* 2012). Assim, seria importante tentar perceber a que espécie pertence o exemplar positivo para *D. immitis*, uma vez que a sua importância enquanto vetor depende das suas características bioecológicas. Neste trabalho, poucos exemplares deste complexo foram capturados, especialmente quando comparado com outros estudos realizados em Portugal (Almeida *et al.* 2008; Osório *et al.* 2010). Isto poderá estar relacionado com os locais escolhidos para as colheitas, que, tal como já foi dito anteriormente, seriam locais particularmente propícios à transmissão de dirofilariose. Esta baixa densidade populacional leva a que este complexo tenha a maior taxa mínima de infeção encontrada, mas, devido a essa mesma densidade, a importância deste complexo enquanto vetor de dirofilariose torna-se reduzida. *Aedes detritus* s.l. apresentou densidades mais elevadas fora dos meses mais quentes e secos do ano, podendo a sua potencial intervenção na transmissão de dirofilariose canina ocorrer fora desse mesmo período.

Perante os resultados obtidos pode afirmar-se que existirão em Portugal várias espécies vetorais de *D. immitis*, pertencendo a três géneros, o que indica uma potencial baixa especificidade entre o parasita e o seu hospedeiro invertebrado.

A dirofilariose canina é uma doença cuja transmissão não depende só das espécies de mosquito vetores, das suas densidades populacionais, da existência de reservatórios, mas também de fatores como temperaturas ambientes favoráveis. Portugal é um país localizado numa região temperada, com condições propícias ao desenvolvimento do parasita nas épocas mais quentes e secas do ano. Pela análise da Figura 39, originada tendo com base unicamente temperaturas médias diárias, ou seja, não considerando quaisquer outros fatores ambientais, como humidade relativa, precipitação ou vento, conclui-se que este fator, nos distritos estudados e durante os anos de colheita, foi favorável ao completo desenvolvimento de *D. immitis* no hospedeiro invertebrado e, portanto, à deteção de espécies dos mosquitos vetores de dirofilariose canina. Todavia, como a seguir será discutido, em determinados distritos, a data escolhida para a colheita de mosquitos não coincidiu com as temperaturas médias mais favoráveis para cumprir o principal objetivo do trabalho.

No que respeita ao distrito de Coimbra, todas as capturas durante os meses de julho, foram efetuadas em dias em que havia a possibilidade de já ter decorrido o desenvolvimento completo do parasita no seu hospedeiro invertebrado. Nas colheitas do mês de maio de 2012, as capturas ocorreram em dias em que a conjuntura dos 30 dias seguintes não era favorável ao completo desenvolvimento do parasita no mosquito. No entanto, dias antes dessa captura, tinham existido dias em que se tinham atingido 130DDU e, portanto, onde num mosquito infetado haveria a possibilidade de desenvolvimento completo do parasita. Essa possibilidade foi confirmada pela deteção de uma fêmea com tórax+cabeça positivo.

Para o distrito de Santarém, há a salientar um lote de *An. atroparvus*, capturado em abril de 2012 e para o qual foi encontrado abdómen positivo. Acontece que os dias que antecederam esse dia de captura não eram favoráveis ao desenvolvimento completo do parasita no seu hospedeiro invertebrado, pelo que esse mosquito eventualmente não se tornaria naturalmente infetante nos próximos 30 dias. Assim as condições meteorológicas desse mês de colheita não foram favoráveis para que se conseguisse atingir o principal objetivo do trabalho, pois não propiciavam o desenvolvimento do parasita até L3. Ainda é muito importante salientar que, pelos critérios que foram definidos, esse dia, e os dias anteriores, ainda pertenciam a período de pré-patência no cão. Poderá levantar-se a seguinte questão: se os cães ainda se encontram no período pré-patente, como é possível capturar exemplares infetados? Na realidade, há duas possíveis respostas a esta pergunta. A primeira é que o período pré-patente é determinado com base no último dia do período anterior em que um cão poderia ser infetado, não tendo em conta a possibilidade de existirem cães infetados em momentos anteriores, pelo que na altura da colheita já apresentavam microfilárias na corrente sanguínea. Por outro lado, este exemplar tratava-se de *An. atroparvus* que, dadas as suas características bioecológicas pode ter passado o inverno como adulto e a sua infeção ter sido adquirida no ano anterior. Relativamente ao mosquito capturado positivo em maio de 2013, neste distrito, admite-se que é pouco provável que na natureza este se tornasse um mosquito infetante nos 30 dias seguintes, pelas mesmas razões da situação anterior.

Por sua vez, no distrito de Setúbal, foram encontrados exemplares infetados por *D. immitis* em julho de 2012, altura durante a qual os cães estariam em risco de ser infetados, uma vez que era um período bastante favorável ao completo desenvolvimento

do parasita no mosquito. Contudo, nenhum exemplar apresentou tórax+cabeça positivo. Relativamente aos exemplares capturados em maio de 2013, constata-se que, nessa altura, ainda não havia uma conjuntura favorável ao desenvolvimento de *D. immitis* até L3, pelo que seria possível encontrar mosquitos com abdómen positivo, mas não com tórax+cabeça positivo. Porém, o único exemplar capturado com tórax+cabeça positivo neste distrito foi capturado precisamente nesta altura. O que pode justificar este facto é que este indivíduo esteve 7 dias em insetário, o que terá sido suficiente para o parasita retomar e completar o seu ciclo. Admitindo uma temperatura constante durante esses 7 dias de 27°C, obtém-se 91 DDU, faltando, teoricamente, 39 DDU para que o desenvolvimento se completasse. Pela análise dos dados de temperaturas médias para a região, conclui-se que, desde que o mosquito se tivesse infetado há 19 dias, tal seria possível. Isto mostra a importância da manutenção dos exemplares recolhidos em insetário, pois caso tal não tivesse acontecido, este exemplar nunca teria sido detetado com tórax+cabeça positivo.

Para Portugal prevêem-se vários cenários de alterações climáticas, que poderão ter impacto em saúde pública e animal, pelo previsível aumento da temperatura média na primavera e no outono (Calheiros *et al.* 2006 *fidae* Almeida 2011). Este aumento poderá levar a um acréscimo da densidade populacional de mosquitos nestes períodos do ano, e conduzirá a um acréscimo não só do período favorável para a sua reprodução, mas também do período favorável à ocorrência do desenvolvimento extrínseco de agentes patogénicos (Almeida 2011), como é o caso de *Dirofilaria* sp.. É importante notar que, ao longo do período de estudo, considerando os 3 distritos como um todo, o número de dias favoráveis à ocorrência de desenvolvimento completo do parasita no seu mosquito vetor variou entre os 117 e os 185 dias/ano, tendo somente a temperatura como base.

Tal como referido anteriormente, as ferramentas GIS são muito úteis em estudos epidemiológicos de doenças transmitidas por vetores com determinantes ambientais, como a dirofilariose, auxiliando a selecionar e aplicar medidas de prevenção e controlo das mesmas (Genchi *et al.* 2005). Tendo em conta que todos estes modelos podem ser melhorados através do maior conhecimento da transmissão da doença, e tendo em conta que a identificação de quais as espécies de mosquito envolvidas na transmissão de *D. immitis* em Portugal é fundamental para esse conhecimento, este trabalho poderá dar um

grande avanço na aplicação destas ferramentas no nosso território. Além disso, uma vez que se constatou que existem espécies de mosquito envolvidas na transmissão de *D. immitis* com uma abundância relativa muito elevada, é importante perceber que aplicar medidas de prevenção e tratamento no reservatório não é suficiente para conseguir controlar a doença, sendo necessário aplicar medidas de controlo vetorial. Só sabendo quais as espécies envolvidas, a escolha destas medidas será eficaz.

Refira-se, no entanto, que não são apenas as determinantes ambientais e as alterações climáticas, *per si*, que contribuem para a dispersão de dirofilariose. As migrações, o transporte de cães pela Europa e, ainda, fatores que possam conduzir à dispersão das espécies vetorais, como a criação de pequenos habitats em áreas selvagens, devido à sua urbanização, também podem conduzir à expansão geográfica de *Dirofilaria* spp. (Genchi *et al.* 2009; Simón *et al.* 2012).

Neste trabalho não foi detetado nenhum caso de *D. repens*, o principal agente causal de dirofilariose na Europa (McCall *et al.* 2008; Ondriska *et al.* 2010; Tappe *et al.* 2014), mas não se pode esquecer que existem alguns casos de dirofilariose humana causados por *D. immitis*, mesmo em Portugal (Rombert *et al.* 1992; Araújo 1996), pelo que se deveria desenvolver trabalhos futuros no sentido de detetar eventuais zonas hiperendémicas de doença, de modo a prevenir futuros casos humanos.

Por outro lado, foram encontrados dois exemplares com bandas cujos fragmentos não correspondiam a nenhuma das filárias possíveis de detetar, com recurso aos *primers* utilizados. Assim, seria conveniente a prossecução destes estudos, particularmente no âmbito da saúde animal, para detetar que outras filárias se encontram em circulação no país.

Concluindo, com este trabalho foi possível identificar quatro potenciais espécies vetorais de *D. immitis* em Portugal, nomeadamente, *An. atroparvus*, *Cx. theileri*, *Ae. caspius* e *Ae. detritus* s.l.. No caso de *Cx. pipiens* s.s. mais estudos seriam necessários para perceber qual o seu verdadeiro papel na transmissão da doença. Relativamente a *Ae. detritus* s.l. seria importante perceber que espécies do complexo se encontram infetadas em Portugal. Uma vez que as filarioses são doenças bastante influenciadas por determinantes ambientais, devido à sua transmissão vetorial, será muito importante continuar a realizar estudos, não só sobre os vetores de dirofilariose, uma parasitose em expansão, mas também sobre vetores de outras filarioses que atualmente poderão estar a

ser negligenciadas, tal como a dirofilariose era até há uns anos atrás, mas que no futuro poderão vir a ter um grande impacto, especialmente, em saúde animal e, previsivelmente, na economia do País. A realização de estudos como este permitirá monitorizar de forma mais correta a epidemiologia e a transmissão da doença através de ferramentas bioinformáticas e de localização geográfica, e ainda aplicar medidas de controlo mais específicas e eficazes na luta contra a mesma.

6. Referências

bibliográficas

6. Referências bibliográficas

- Abraham, D., 1988. Biology of *Dirofilaria immitis*. In P. F. L. Boreham & R. B. Atwell, eds. *Dirofilaria*. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, pp. 29–46.
- Agoulon, A., Guillemeau, J. & Marjolet, M., 1999. Le taxon *Aedes detritus* (Haliday, 1833) sur le littoral Atlantique français (Diptera: Culicidae). *Annales Societe Entomologique de France*, 35 (supl.), pp.263–267.
- Alho, A.M., Landum, M., Ferreira, C., Meireles, J., Gonçalves, L., Madeira de Carvalho, L. & Belo, S., 2014a. Prevalence and seasonal variations of canine dirofilariosis in Portugal. *Veterinary Parasitology* <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.08.014>
- Alho, A.M., Meireles, J., Belo, S. & Madeira de Carvalho, L., 2014b. Dirofilariose Canina e Felina , uma Parasitose em Evolução (I) – Etiologia , Biologia e Epidemiologia. *Clínica Animal*, 2(I), pp.20–25.
- Almeida, A.P.G., Galão, R.P., Sousa, C.A., Novo, M.T., Parreira, R., Pinto, J., Piedade, J. & Esteves, A., 2008. Potential mosquito vectors of arboviruses in Portugal: species, distribution, abundance and West Nile infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(8), pp.823–32.
- Almeida, A.P.G., 2011. Os mosquitos (Diptera, Culicidae) e a sua importância médica em Portugal - Desafios para o Século XXI. *Acta Médica Portuguesa*, 24(6), pp.961–974.
- Almeida, A.S. & Marques, P., 2013. Boas Práticas no Cultivo de Arroz por Alagamento, em Portugal. In *A importância da cultura do arroz em Portugal e no Mundo*. INIAV, Oeiras.
- Anderson, R., 2000. *Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission*. 2nd ed., Wallingford, UK: CAB International Publishing.
- Aranda, C., Panyella, O., Eritja, R. & Castellà, J., 1998. Canine filariasis. Importance and transmission in the Baix Llobregat area, Barcelona (Spain). *Veterinary Parasitology*, 77(4), pp.267–75.
- Araújo, A., 1996. Canine and human *Dirofilaria immitis* infections in Portugal. A review. *Parassitologia*, 38, p.366.

- Bahnck, C.M. & Fonseca, D.M., 2006. Rapid assay to identify the two genetic forms of *Culex* (*Culex*) *pipiens* L. (Diptera: Culicidae) and hybrid populations. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(2), pp.251–5.
- Bargues, M.D., Morchón, R., Latorre, J.M., Cancrini, G., Mas-Coma, S. & Simón, F., 2006. Ribosomal DNA second internal transcribed spacer sequence studies of Culicid vectors from an endemic area of *Dirofilaria immitis* in Spain. *Parasitology Research*, 99(3), pp.205–13.
- Bartholomay, L.C., 2014. Infection barriers and responses in mosquito-filarial worm interactions. *Current Opinion in Insect Science*.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cois.2014.08.006>
- Becker, N., Petric, D., Zgomba, M., Boase, C., Madon, M., Dahl, C. & Kaiser, A., 2010. *Mosquitoes and Their Control* 2nd ed., Berlin: Springer-Verlag, p.577.
- Beerntsen, B.T., James, A.A. & Christensen, B.M., 2000. Genetics of mosquito vector competence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, pp.115–137.
- Bernardi, M., 2008. Global climate change-a feasibility perspective of its effect on human health at a local scale. *Geospatial Health*, 2(2), pp.137–50.
- Biskin, Z., Duzlu, O., Yildirim, A. & Inci, A., 2010. The molecular diagnosis of *Dirofilaria immitis* in vector mosquitoes in Felahiye district of Kayseri. *Turkish Society for Parasitology*, 34(3), pp.200–5.
- Bocková, E., Rudolf, I., Kocisova, A., Betasova, L., Venclikova, K., Mendel, J. & Hubálek, Z., 2013. *Dirofilaria repens* microfilariae in *Aedes vexans* mosquitoes in Slovakia. *Parasitology Research*, 112(10), pp.3465–70.
- Brengues, C., Ferré, J.B., Le Goff, G., Lami, P., Pratlong, F., Pasteur, N., Lagneau, C., Simard, F. & Robert, V., 2014. A multiplex PCR to differentiate the two sibling species of mosquitoes *Ochlerotatus detritus* and *Oc. coluzzii* and evidence for further genetic heterogeneity within the Detritus complex. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.07.010>

- Cambournac, F. & Hill, R., 1938. The biology of *Anopheles maculipennis*, var. *atroparvus* in Portugal. *Transactions of the Third International Congress of Tropical Medicine and Malaria*, II, pp.178–184.
- Cancrini, G., Pietrobelli, M., Frangipane di Regalbono, A.F., Tampieri, M.P. & della Torre, A., 1995. Development of *Dirofilaria* and *Setaria* nematodes in *Aedes albopictus*. *Parassitologia*, 37(2-3), pp.141–5.
- Cancrini, G. Frabgioane di Regalbono, A., Ricci, I., Tessarin, C., Gabrielli, S. & Pietrobelli, M., 2003. *Aedes albopictus* is a natural vector of *Dirofilaria immitis* in Italy. *Veterinary Parasitology*, 118(3-4), pp.195–202.
- Cancrini, G., Magi, M., Gabrielli, S., Arispici, F., Tolari, M., Dell'Omodarme, M. & Prati, M.C., 2006. Natural vectors of dirofilariasis in rural and urban areas of the Tuscan region, central Italy. *Journal of Medical Entomology*, 43(3), pp.574–9.
- Cancrini, G., Scaramozzino, P., Gabrielli, S., di Paolo, M., Toma, L. & Romi, R., 2007. *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* implicated as natural vectors of *Dirofilaria repens* in central Italy. *Journal of Medical Entomology*, 44(6), pp.1064–6.
- Cancrini, G. & Gabrielli, S., 2007. Vectors of *Dirofilaria* nematodes: biology, behaviour and host/parasite relationships. In C. Genchi, L. Rinaldi, & G. Cringoli, eds. *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infection. Naples, Italy: Mappe Parassitologiche, pp. 49–58.
- Canestri Trotti, G., Pampiglione, S. & Rivasi, F., 1997. The species of the genus *Dirofilaria*, Railliet & Henry, 1911. *Parassitologia*, 39(4), pp.369–74.
- Capelli, G., Frangipane di Regalbono, A., Simonato, G., Cassini, R., Cazzin, S., Cancrini, G., Otranto, D. & Pietrobelli, M., 2013. Risk of canine and human exposure to *Dirofilaria immitis* infected mosquitoes in endemic areas of Italy. *Parasites & Vectors*, 6, p.60.
- Capinha, C., Gomes, E., Reis, E., Rocha, J., Sousa, C.A., do Rosário, V.E. & Almeida, A.P., 2009. Present habitat suitability for *Anopheles atroparvus* (Diptera, Culicidae) and its coincidence with former malaria areas in mainland Portugal. *Geospatial Health*, 3(2), pp.177–87.

- Cardoso, L., Mendão, C. & Madeira de Carvalho, L., 2012. Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma* spp. and *Leishmania infantum* in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal—a national serological study. *Parasites & Vectors*, 5, p.62.
- Castillo, J.C., Reynolds, S.E. & Eleftherianos, I., 2011. Insect immune responses to nematode parasites. *Trends in Parasitology*, 27(12), pp.537–547.
- CDC, 2012. Centers for Disease Control and Prevention. *Parasites - Dirofilariasis*. Disponível em: http://www.cdc.gov/parasites/dirofilariasis/biology_d_immitis.html [acedido em 11 de agosto de 2014].
- Christensen, B.M., 1978. *Dirofilaria immitis*: Effect on the longevity of *Aedes trivittatus*. *Experimental Parasitology*, 44(1), pp.116–123.
- Christensen, B.M., 1981. Effect of *Dirofilaria immitis* on the fecundity of *Aedes trivittatus*. *Mosquito News*, 41, pp.78–81.
- Christensen, B.M., Li, J., Chen, C. & Nappi, A., 2005. Melanization immune responses in mosquito vectors. *Trends in Parasitology*, 21(4), pp.192–9.
- Coluzzi, M., Dallai, R. & Insom, E., 1981. Morfologia e funzione delle armature cibarie nelle zanzare. *Parassitologia*, 23, pp.164–168.
- Cringoli, G., Rinaldi, L., Veneziano, V. & Musella, V., 2005. Disease mapping and risk assessment in veterinary parasitology: some case studies. *Parassitologia*, 47(1), pp.9–25.
- Esteves, A., Almeida, A.P., Galão, R.P., Parreira, R., Piedade, J., Rodrigues, J.C., Sousa, C.A. & Novo, M.T., 2005. West Nile Virus in Southern Portugal, 2004. *Vector borne and Zoonotic Disease*, 5, pp.410–413.
- Favia, G., Lanfrancotti, A., Della Torre, A., Cancrini, G. & Coluzzi, M., 1996. Polymerase chain reaction—identification of *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis*. *Parasitology*, 6, pp.567–571.
- Genchi, C., Rinaldi, L., Cascone, C., Mortarino, M. & Cringoli, G., 2005. Is heartworm disease really spreading in Europe? *Veterinary Parasitology*, 133(2-3), pp.137–48.

- Genchi, C., Guerrero, J., McCall, J.W. & Venco, L., 2007. Epidemiology and prevention of *Dirofilaria* infection in dogs and cats. In C. Genchi, L. Rinaldi, & G. Cringoli, eds. *Dirofilaria immitis and D. repens in dog and cat and human infection*. Naples, Italy: Mappe Parassitologiche, pp. 146-161.
- Genchi, C., Rinaldi, L., Mortarino, M., Genchi, M. & Cringoli, G., 2009. Climate and *Dirofilaria* infection in Europe. *Veterinary Parasitology*, 163(4), pp.286–92.
- Genchi, C., Kramer, L. & Rivasi, F., 2011. Dirofilarial infections in Europe. *Vector-borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, 11, pp.1307–1317.
- Gomes, B., Parreira, P., Sousa, C.A., Novo, M.T., Almeida, A.P., Donnelly, M.J. & Pinto, J., 2012. The *Culex pipiens* complex in continental Portugal: distribution and genetic structure. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 28(4 Suppl), pp.75–80.
- Gomes, B., Sousa, C.A., Vicente, J.L., Pinho, L., Calderón, I., Arez, E., Almeida, A.P.G., Donnelly, M. & Pinto, J., 2013. Feeding patterns of molestus and pipiens forms of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in a region of high hybridization. *Parasites & Vectors*, 6, p.93.
- Gouveia, M.I.M.S.A.V., 2007. *Susceptibility of mosquito vectors to Dirofilaria immitis on Madeira Island, Portugal*. Tese Doutoramento, Universidade da Madeira.
- Grandi, G., Zivicnjak, T. & Beck, R., 2007. Pathogenesis of *Dirofilaria* spp. infections. In C. Genchi, L. Rinaldi, & G. Cringoli, ed. *Dirofilaria immitis and D. repens in dog and cat and human infection*. Naples, Italy: Mappe Parassitologiche, pp. 60–66.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, pp.95–98.
- Hill, C. & MacDonald, J., 2008. Medical Entomology - Purdue University. Disponível em: <http://extension.entm.purdue.edu/publichealth/resources.html> [acedido em 11 de outubro de 2014].
- Hillyer, J.F., 2010. Mosquito immunity. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 708, pp.218–38.

- Hoch, H. & Strickland, K., 2008. Canine and feline dirofilariasis: prophylaxis, treatment, and complications of treatment. *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian*, 30(3), pp.146–151.
- Infopédia, 2014a. Coimbra. *Infopedia [em linha]*. Disponível em: [http://www.infopedia.pt/\\$coimbra,2](http://www.infopedia.pt/$coimbra,2) [acedido em 18 de agosto de 2014].
- Infopédia, 2014b. Santarém. *Infopedia [em linha]*. Disponível em: [www.infopedia.pt/\\$santarem](http://www.infopedia.pt/$santarem) [acedido em 18 de agosto de 2014].
- Infopédia, 2014c. Setúbal. *Infopedia [em linha]*. Disponível em: [www.infopedia.pt/\\$setubal](http://www.infopedia.pt/$setubal) [acedido em 18 de agosto de 2014].
- Intermill, R.W., 1973. Development of *Dirofilaria immitis* in *Aedes triseriatus* Say. *Mosquito News*, 33, pp.176–180.
- Kalluri, S., Gilruth, P., Rogers, D. & Szczur, M., 2007. Surveillance of arthropod vector-borne infectious diseases using remote sensing techniques: a review. *PLoS pathogens*, 3(10), pp.1361–71.
- Kartman, L., 1953. Factors influencing infection of the mosquito with *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856). *Experimental Parasitology*, 2, pp.27–78.
- Kramer, L.H., Kartashev, V.V., Grandi, G., Morchón, R., Nagornii, S.A., Karanis, P. & Simón, F., 2007. Human subcutaneous dirofilariasis, Russia. *Emerging Infectious Diseases*, 13(1), pp.150–2.
- Lee, S.-E., Kim, H.C., Chong, S.T., Klein, T.A & Lee, W.J., 2007. Molecular survey of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* by direct PCR for wild caught mosquitoes in the Republic of Korea. *Veterinary Parasitology*, 148(2), pp.149–55.
- Lowrie, R.C., 1991. Poor vector efficiency of *Culex quinquefasciatus* following infection with *Dirofilaria immitis*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 7(1), pp.30–6.
- Manfredi, M.T., Di Cerbo, A. & Genchi, M., 2007. Biology of filarial worms parasitizing dogs and cats. In C. Genchi, L. Rinaldi, & G. Cringoli, eds. *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infection. Naples, Italy: Mappe Parassitologiche, pp. 41–45.

- McCall, J.W., Genchi, C., Kramer, L.H., Guerrero, J. & Venco, L., 2008. Heartworm disease in animals and humans. *Advances in Parasitology*, 66, pp.193–285.
- Medlock, J.M., Barrass, I., Kerrod, E., Taylor, M.A. & Leach, S., 2007. Analysis of climatic predictions for extrinsic incubation of *Dirofilaria* in the United Kingdom. *Vector borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, 7, pp.4–14.
- Monteiro, L.C.C., de Souza, J.R.B. & de Albuquerque, C.M.R., 2007. Eclosion rate, development and survivorship of *Aedes albopictus* (Skuse)(Diptera: Culicidae) under different water temperatures. *Neotropical Entomology*, 36(6), pp.966–71.
- Montoya, J., Morales, M., Ferrer, O., Molina, J.M. & Corbera, J.A., 1998. The prevalence of *Dirofilaria immitis* in Gran Canaria, Canary Islands, Spain (1994–1996). *Veterinary Parasitology*, 75, pp.221–226.
- Morchón, R., Bargues, M.D. Latorre, J.M., Melero-Alcíbar, R., Pou-Barreto, C., Mas-Coma, S. & Simón, F., 2007. Haplotype H1 of *Culex pipiens* implicated as natural vector of *Dirofilaria immitis* in an endemic area of Western Spain. *Vector borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, 7(4), pp.653–8.
- Morchón, R., Simón, F., González-Miguel, J., Mellado, I., 2009. Relationship *Dirofilaria*/hosts: cellular and molecular mechanisms of the heartworm disease vascular pathology. In R. Morchón, F. Simón, J.A. Montoya, C. Genchi, eds. *Proceedings of Second European Dirofilaria Days, 16-18 September*. Salamanca, Spain, pp. 116–123.
- Morchón, R., Bargues, M.D., Latorre-Estivalis, J.M., Pou-Barreto, C., Melero-Alcíbar, R., Moreno, M., Valladares, B., Molina, R., Montoya-Alonso, J.A., Mas-Coma, S. & Simón, F., 2011. Molecular characterization of *Culex theileri* from Canary Islands, Spain, a potential vector of *Dirofilaria immitis*. *Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 3(1), p.7.
- Muro, A., Genchi, C., Cordero, M. & Simón, F., 1999. Human Dirofilariasis in the European Union. *Parasitology Today*, 15, pp.386–389.
- OMS (Organização Mundial de Saúde), 2004. *The vector-borne human infections of Europe: Their distribution and burden on public health*. Copenhagen, Dinamarca: Gabinete Regional para a Europa da OMS. p. 144

- Ondriska, F., Lengyel, D., Miterpakova, M., Lengyelova, B., Streharova, A. & Dubinsky, P., 2010. Human dirofilariosis in the Slovak Republic - a case report. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 17, pp.169–171.
- Osório, H.C., Amaro, F., Zé-Zé, L., Pardal, S., Mendes, L., Ventim, R., Ramos, J.A., Nunes, S. & Alves, M.J., 2010. Mosquito species distribution in mainland Portugal 2005-2008. *Journal of the European Mosquito Control Association*, 28(October), pp.187–193.
- Otranto, D., Capelli, G. & Genchi, C., 2009. Changing distribution patterns of canine vector borne diseases in Italy: leishmaniosis vs. dirofilariosis. *Parasites & Vectors*, 2 Suppl 1, p.S2.
- Otranto, D., Dantas-Torres, F., Brianti, E., Traversa, D., Petrić, D., Genchi, C. & Capelli, G., 2013. Vector-borne helminths of dogs and humans in Europe. *Parasites & Vectors*, 6, p.16.
- Pampiglione, S. & Rivasi, F., 2000. Human dirofilariasis due to *Dirofilaria* (Nochtiella) *repens*: an update of world literature from 1995 to 2000. *Parassitologia*, 42(3-4), pp.231–54.
- Pampiglione, S. & Rivasi, F., 2001. Dirofilariasis. In *Encyclopedia of Arthropod-Transmitted Infections of Man and Domesticated Animals*. Wallingford, UK: CABI Publishing, pp. 143–150.
- Pasteur, N., Rioux, J.A., Guilvard, E., Pech-Perieres, M.J. & Verdier, J.M., 1977. Presence in Camargue of two sympatric, sexually isolated forms of *Aedes* (*Ochlerotatus*) *detritus* (Haliday, 1833) [Diptera-Culicidae] (author's transl). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 52(3), pp.325–37.
- Pires, C., Ribeiro, H., Capela, R. & Ramos, H., 1982. Research on the mosquitoes of Portugal (Diptera, Culicidae) VI - The mosquitoes of Alentejo. *Anais Instituto Higiene Medicina Tropical*, 8, pp.79–101.
- Ramos, H., Ribeiro, H., Pires, C.A. & Capela, R., 1978. Research on the mosquitoes of Portugal (Diptera, Culicidae) II - The mosquitoes of Algarve. *Anais Instituto Higiene Medicina Tropical*, 1, pp.79–101.

- Ramos, H., Ribeiro, H., Afonso, M.O., Barreiro, C.P. & Novo, M.T., 1993. Estudo dos vectores da dirofilariose na área de Castro Marim. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 1(2), p.226.
- Reinert, J.E., 2000. New classification for composite genus *Aedes* (Diptera: Culicidae: Aedini), elevation of subgenus *Ochlerotatus* to generic rank, reclassification of the other subgenera, and notes on certain sub genera and species. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 16(3), pp. 175-188.
- Ribeiro, H., Ramos, H.C. & Pires, C.A., 1983. Contribuição para o estudo das filariases animais em Portugal. *Jornal da Sociedade de Ciências Médicas de Lisboa*, 147, pp.143–146.
- Ribeiro, H., Ramos, H., Capela, R. & Pires, C.A., 1992. Research on the mosquitoes of Portugal (Diptera, Culicidae) II - The mosquitoes of the Beiras. *Garcia de Horta - Série Zoológica*, 16, pp.137–161.
- Ribeiro, H. & Ramos, H.C., 1999. Identification keys of the mosquitoes (Diptera: Culicidae) of Continental Portugal, Açores and Madeira. *European Mosquito Bulletin*, (3), pp.1–32.
- Rinaldi, L., Musella, V., Biggeri, A. & Cringoli, G., 2006. New insights into the application of geographical information systems and remote sensing in veterinary parasitology. *Geospatial Health*, 1(1), pp.33–47.
- Rioux, J.A., Guilvard, E. & Pasteur, N., 1998. Description of *Aedes* (*Ochlerotatus*) *coluzzii* n. sp. (Diptera, Culicidae), twin A species of the detritus complex. *Parassitologia*, 40(3), pp.353–60.
- Rishniw, M., Barr, S.C., Simpson, K.W., Frongillo, M.F., Franz, M. & Alpizar, J.L., 2006. Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. *Veterinary Parasitology*, 135(3-4), pp.303–14.
- Rocconi, F., Di Tommaso, M., Traversa, D., Palmieri, C., Pampurini, F. & Boari, A., 2012. Allergic dermatitis by *Dirofilaria repens* in a dog: clinical picture and treatment. *Parasitology Research*, 111, pp.493–496.
- Rodhain, F. & Perez, C., 1985. *Précis d'entomologie médicale et vétérinaire*, Paris: Maloine SA, p.87.

- Rombert, P.C., Nunes, J., Azevedo, V. & Sinari, V., 1992. Um caso de dirofilariose ocular. In *1^as Jornadas de Doenças Infecciosas e de Medicina Tropical, Instituto de Higiene e Medicina Tropical*. Lisboa, Portugal.
- Rossi, L., Pollono, F., Meneguz, P.G. & Cancrini, G., 1999. Four species of mosquito as possible vectors for *Dirofilaria immitis* piedmont rice-fields. *Parassitologia*, 41(4), pp.537–42.
- Santa-Ana, M., Khadem, M. & Capela, R., 2006. Natural infection of *Culex theileri* (Diptera: Culicidae) with *Dirofilaria immitis* (Nematoda: Filarioidea) on Madeira Island, Portugal. *Journal of Medical Entomology*, 43(1), pp.104–6.
- Sassnau, R., Czajka, C., Kronefeld, M., Werner, D., Genchi, C., Tannich, E. & Kampen, H., 2014. *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis* DNA findings in mosquitoes in Germany: temperature data allow autochthonous extrinsic development. *Parasitology Research*, 113(8), pp.3057–61.
- Simón, F., Siles-Lucas, M., Morchón, R., González-Miguel, J., Mellado, I., Carretón, E. & Montoya-Alonso, J.A., 2012. Human and animal dirofilariasis: the emergence of a zoonotic mosaic. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(3), pp.507–44.
- Smith, J.L. & Fonseca, D.M., 2004. Rapid assays for identification of members of the *Culex* (*Culex*) *pipiens* complex, their hybrids, and other sibling species (Diptera: culicidae). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 70(4), pp.339–345.
- Stothard, J.R., Hughes, S. & Rollinson, D., 1996. Variation within the Internal Transcribed Spacer (ITS) of ribosomal DNA genes of intermediate snail hosts within the genus *Bulinus* (Gastropoda: Planorbidae). *Acta Tropica*, 61, pp.19–29.
- Swain, V., Seth, R.K., Mohanty, S.S. & Raghavendra, K., 2008. Effect of temperature on development, eclosion, longevity and survivorship of malathion-resistant and malathion-susceptible strain of *Culex quinquefasciatus*. *Parasitology Research*, 103(2), pp.299–303.
- Tappe, D., Plauth, M., Bauer, T., Muntau, B., Dießel, L., Tannich, E., & Herrmann-Trost, P., 2014. A case of autochthonous human *Dirofilaria* infection, Germany, March 2014. *Euro Surveillance*, 19(17).

- Tarello, W., 2010. Clinical aspects of dermatitis associated with *Dirofilaria repens* in pets. In *Dermatitis linked with helminthic infections. Merial Pre-Congress of the ESVD-ECVD Meeting*. Florence, Italy.
- Tarello, W., 2011. Clinical Aspects of Dermatitis Associated with *Dirofilaria repens* in Pets: A Review of 100 Canine and 31 Feline Cases (1990-2010) and a Report of a New Clinic Case Imported from Italy to Dubai. *Journal of Parasitology Research*, 2011, p.1-7.
- Tasić-Otašević, Gabrielli, S.V., Tasić, A.V., MiladinovićTasić, M.L., Kostić, J.T., Ignjatović, A.M., Dragonjić, L.D.P., Milošević, Z.G., Arsić-Arsenijević, V.S. & Cancrini, G.A., 2014. Seroreactivity to *Dirofilaria* antigens in people from different areas of Serbia. *BMC infectious diseases*, 14, p.68.
- The Ramsar Convention on Wetlands, 2013. The Annotated Ramsar List: Portugal. Disponível em: www.ramsar.org/cda/en/ramsar-documents-list-annotated-portugal/main/ramsar/1-31-218%5E16081_4000_0__ [acedido em 11 de outubro de 2014].
- Theis, J., Gilson, A., Simon, G.E., Bradshaw, B. & Clark, D., 2001. Case report: unusual location of *Dirofilaria immitis* in a 28-year old man necessitates orchiectomy. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 64, pp.317–322.
- Vegni Talluri, M. & Cancrini, G., 1994. An ultrastructural study on the early cellular response to *Dirofilaria immitis* (Nematoda) in the Malpighian tubules of *Aedes aegypti* (refractory strains). *Parasite (Paris, France)*, 1(4), pp.343–8.
- Venco, L., Genchi, M., Genchi, C., Gatti, C., Gatti, D. & Kramer, L., 2011. Can heartworm prevalence in dogs be used as provisional data for assessing the prevalence of the infection in cats?. *Veterinary Parasitology*, 176(4), pp.300–3.
- Veronesi, R., Gentile, G., Carrieri, M., Maccagnani, B., Syermieri, L. & Bellini, R., 2012. Seasonal pattern of daily activity of *Aedes caspius*, *Aedes detritus*, *Culex modestus*, and *Culex pipiens* in the Po Delta of northern Italy and significance for vector-borne disease risk assessment. *Journal Vector Ecology*, 37(1), pp.49–61.

- Vezzani, D. & Carbajo, A.E., 2006. Spatial and temporal transmission risk of *Dirofilaria immitis* in Argentina. *International Journal for Parasitology*, 36(14), pp.1463–72.
- Vezzani, D., Mesplet, M., Eiras, D.F., Fontarrosa, M.F. & Schnittger, L., 2011. PCR detection of *Dirofilaria immitis* in *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* from urban temperate Argentina. *Parasitology Research*, 108(4), pp.985–989.
- Vieira, A.L., Vieira, M.J., Oliveira, J.M., Simões, A.R., Diez-Baños, P. & Gestal, J., 2014. Prevalence of canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in dogs of central Portugal. *Parasite (Paris, France)*, 21(5), p.7.
- Yildirim, A., Inci, A., Duzlu, O., Biskin, Z., Ica, A. & Sahin, I., 2011. *Aedes vexans* and *Culex pipiens* as the potential vectors of *Dirofilaria immitis* in Central Turkey. *Veterinary Parasitology*, 178(1-2), pp.143–147.

7. Anexos

7. Anexos

7.1 Anexo I

Protocolo de Extração de ADN adaptado do método CTAB descrito por Stothard *et al.* (1996):

1. Adicionar à amostra 600µl de tampão CTAB (100mM Tris, 1,4M NaCl, 20mM EDTA, 2% CTAB, 0,2% Mercaptoetanol) e macerar.
2. Adicionar 10µl de Proteínase K (Bioline) 20mg/ml.
3. Incubar a amostra a 55°C, durante 90 minutos, com agitação. Em alternativa, a amostra pode ser deixada *overnight*, a 37°C, sem agitação.
4. Adicionar 600µl de Clorofórmio:Isoamil 24:1.
5. Agitar a amostra, por inversão, 2 minutos.
6. Efetuar uma centrifugação rápida e colocar 800µl de Etanol absoluto gelado em tubos novos.
7. Transferir o sobrenadante da amostra para este último tubo, descartando-se o original.
8. Centrifugar a amostra a 13000rpm, durante 20 minutos. Descartar o sobrenadante.
9. Adicionar 500µl de Etanol 70%, e centrifugar, novamente, a 13000rpm, durante 15 minutos. Descartar o sobrenadante.
10. Deixar o Etanol evaporar e adicionar 50µl de tampão TE.

7.2 Anexo II

- Sequência do *primer* DIDR-F1: 5' - AGTGCGAATTGCAGACGCATTGAG - 3'
- Sequência do *primer* DIDR-R1: 5' - AGCGGGTAATCACGACTGAGTTGA - 3'
- Sequência do *primer* CQ11F2: 5' - GATCCTAGCAAGCGAGAAC - 3'
- Sequência do *primer* pipCQ11R: 5' - CATGTTGAGCTTCGGTGAA - 3'
- Sequência do *primer* molCQ11R: 5' - CCCTCCAGTAAGGTATCAAC - 3'
- Sequência do *primer* ACEquin: 5' – CCTTCTTGAATGGCTGTGGCA – 3'
- Sequência do *primer* ACEpip: 5' – GGAAACAACGACGTATGTACT – 3'
- Sequência do *primer* B1246s: 5' – TGGAGCTCCTCTTCACGG – 3'

7.3 Anexo III

Protocolo de purificação de ADN com o *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen):

1. Adicionar a quantidade equivalente a 5 vezes o volume de uma amostra de PCR de tampão PB.
2. Colocar a coluna *QIAquick* num tubo de 2ml fornecido.
3. Aplicar a amostra na coluna *QIAquick* e centrifugar 30–60 segundos.
4. Descartar o sobrenadante e colocar a coluna *QIAquick* no mesmo tubo.
5. Adicionar 750µl de tampão PE à coluna *QIAquick* e centrifugar 30–60 segundos.
6. Descartar o sobrenadante e colocar a coluna *QIAquick* no mesmo tubo.
7. Centrifugar a coluna mais 1 minuto à velocidade máxima.
8. Colocar a coluna *QIAquick* num tubo 1,5ml de microcentrífuga.
9. Eluir o ADN em 30µl de tampão EB. Esperar 1 minuto e centrifugar por 1 minuto.
10. Descartar a coluna.

7.4 Anexo IV

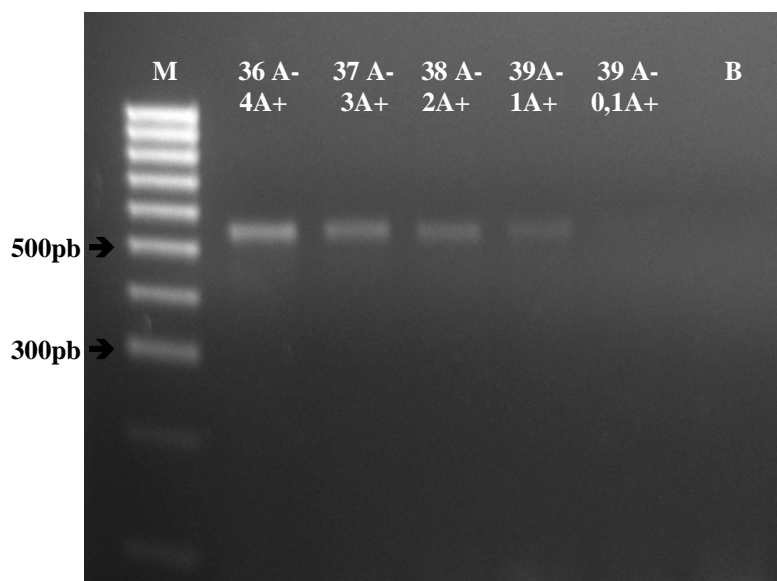


Figura 40. Electroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR do teste de sensibilidade para determinação do número mínimo de abdômenes positivos (A+) possíveis de detetar num lote de 40 exemplares. B- Branco; M- Marcador de peso molecular.

7.5 Anexo V

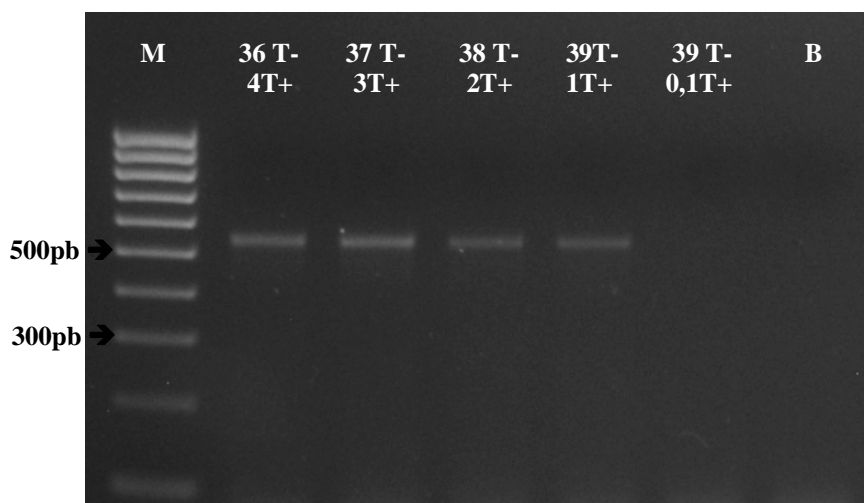


Figura 41. Electroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR do teste de sensibilidade para determinação do número mínimo de tórax+cabeça positivos (T+) possíveis de detetar num lote de 40 exemplares. B- Branco; M- Marcador de peso molecular.

7.6 Anexo VI

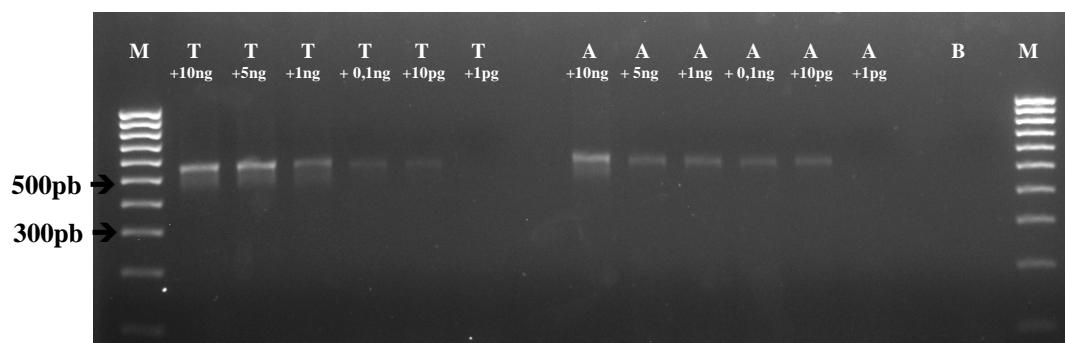


Figura 42. Electroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR do teste de sensibilidade para determinação da quantidade mínima de parasita possível de ser detetada em 80ng de ADN de tórax+cabeça (T) e abdómen (A) de mosquito. B- Branco; M- Marcador de peso molecular.